



(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A23L 1/0522 (2006.01)

A23L 1/10 (2006.01)

A23L 1/182 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0001057

(43) 공개일자 2007년01월03일

(21) 출원번호 10-2006-7008107

(22) 출원일자 2006년04월27일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2006년04월27일

(86) 국제출원번호 PCT/AU2004/001517

(87) 국제공개번호 WO 2005/040381

국제출원일자 2004년10월27일

국제공개일자 2005년05월06일

(30) 우선권주장 60/515,102 2003년10월27일 미국(US)

(71) 출원인 코몬웰스 싸이언티픽 앤드 인더스트리얼 리서치 오가니제이션  
오스트레일리아, 2612 오스트레일리언 캐피탈 테리토리, 캠퍼, 라임스톤 에베뉴

(72) 발명자 리 존지이  
오스트레일리아, 2617 오스트레일리언 캐피탈 테리토리칼린 캄파스페  
서큐잇 51  
모델 매츄 케네디  
오스트레일리아, 2614 오스트레일리언 캐피탈 테리토리아란다 울랄 플  
레이스 13  
라만 사데커  
오스트레일리아, 2913 오스트레일리언 캐피탈 테리토리니콜스 템퍼레  
이 스트리트 36

(74) 대리인 서대석  
김창선

전체 청구항 수 : 총 47 항

(54) 아밀로스 비율이 증가된 전분을 갖는 쌀 및 이의 생성물

(57) 요약

본 발명은 배유중의 상대적 아밀로스 함량이 높은 곡류를 생성하는 감소된 수준의 전분 분지 효소를 갖는 쌀에 관한 것이다. 본 발명의 쌀 곡류는 아밀로펙틴 합성 경로에서의 병변에도 불구하고 비-수축형 표현형을 가질 수 있으며, 트랜스제닉 또는 비-트랜스제닉일 수 있다.

대표도

도 1

## 특허청구의 범위

### 청구항 1.

곡류의 전분중의 아밀로스 비율이 40% 이상인 전분을 포함하는 쌀 식물로부터 얻은 곡류.

### 청구항 2.

제1항에 있어서, 2 이상의 유전적 변이를 포함하며, 여기서 하나의 유전적 변이는

- a) SBEIIa 발현 및/또는 활성을 억제하는 *SBEIIa* 유전자의 돌연변이 및
- b) SBEIIa 발현 및/또는 활성을 억제하는 도입된 핵산으로 구성된 군에서 선택되고,

2차 유전적 변이는

- c) SBEIIb 발현 및/또는 활성을 억제하는 *SBEIIb* 유전자의 돌연변이 및
- d) SBEIIb 발현 및/또는 활성을 억제하는 도입된 핵산으로 구성된 군에서 선택되는 것인 곡류.

### 청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서, 감소된 수준의 SBEIIa 및 SBEIIb 단백질 및/또는 활성을 포함하는 것인 곡류.

### 청구항 4.

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 곡류의 전분중의 아밀로스 비율이 50% 이상인 것인 곡류.

### 청구항 5.

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 트랜스유전자를 포함하는 것인 곡류.

### 청구항 6.

제5항에 있어서, 트랜스유전자는 안티센스, 보조억제, 리보자임 또는 2가닥 RNA 분자를 암호화하는 것인 곡류.

### 청구항 7.

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 비-트랜스제닉인 것인 곡류.

### 청구항 8.

제2항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 있어서, 감소된 수준의 SBEI 단백질 및/또는 활성을 더 포함하는 것인 곡류.

#### 청구항 9.

제1항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, ADP 글루코스 피로포스포릴라제, GBSS, SSL, SSII, SSIII, 이소아밀라제 타입의 탈분지 효소 및 풀룰라나제 타입의 탈분지 효소로 구성된 군에서 선택된 변형된 수준의 단백질 및/또는 효소 활성을 포함하는 것인 곡류.

#### 청구항 10.

제9항에 있어서, 변형된 수준의 GBSS 단백질 및/또는 효소 활성을 포함하는 것인 곡류.

#### 청구항 11.

제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 있어서, 비-수축형인 것인 곡류.

#### 청구항 12.

제1항 내지 제11항 중 어느 하나의 항에 있어서, 평균 중량이 약 25 mg 이상인 현미인 것인 곡류.

#### 청구항 13.

제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 곡류중의 50% 이상의 전분 과립은 편광하에서 관찰시 비-복굴절을 나타내는 것인 곡류.

#### 청구항 14.

제1항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 있어서, 전분 함량은 등가의 그러나 변형되지 않은 곡류의 전분 함량의 90% 이상인 것인 곡류.

#### 청구항 15.

제2항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 있어서, *SBEIIa* 또는 *SBEIIb* 유전자의 무의미(null) 돌연변이를 포함하는 것인 곡류.

#### 청구항 16.

제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 있어서, 인디카(*Indica*) 변종을 갖거나 또는  $W_x^a$  대립유전자를 포함하는 것인 곡류.

#### 청구항 17.

제1항 내지 제16항 중 어느 하나의 항에 따른 곡류를 생성할 수 있는 쌀 식물.

#### 청구항 18.

제1항 내지 제16항 중 어느 하나의 항에 따른 곡류로부터 추출된 전분 과립.

#### 청구항 19.

제1항 내지 제16항 중 어느 하나의 항에 의한 곡류로부터 추출한 전분.

#### 청구항 20.

제1항 내지 제16항 중 어느 하나의 항에 따른 곡류로부터 생성된 밀가루 또는 전분을 포함하는 생성물.

#### 청구항 21.

제20항에 있어서, 밀가루 또는 전분을 다른 공급원으로부터의 밀가루 또는 전분과 혼합하는 것인 생성물.

#### 청구항 22.

제20항에 있어서, 비-식료품인 것인 생성물.

#### 청구항 23.

제19항의 전분 및 또다른 식료품 성분 또는 물을 포함하는 조성물.

#### 청구항 24.

a) 유전적 변이를 부모 쌀 식물 또는 종자에 도입하는 단계; 및

b) 부모 쌀 식물 또는 종자의 자손 식물을 동정하는 단계 (여기서 자손 식물의 곡류의 전분은 40% 이상의 아밀로스를 포함 함)를 포함하는, 40% 이상의 아밀로스를 포함하는 전분을 갖는 곡류를 생성할 수 있는 쌀 식물의 생성 방법.

#### 청구항 25.

제24항에 있어서, 자손 쌀 식물은 2 이상의 유전적 변이를 포함하며, 여기서 하나의 유전적 변이는

e) SBEIIa 발현 및/또는 활성을 억제하는 *SBEIIa* 유전자의 돌연변이, 및

f) SBEIIa 발현 및/또는 활성을 억제하는 도입된 핵산으로 구성된 군에서 선택되며,

2차 유전적 변이는

g) SBEIIb 발현 및/또는 활성을 억제하는 *SBEIIb* 유전자의 돌연변이 및

h) SBEIIb 발현 및/또는 활성을 억제하는 도입된 핵산으로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 26.

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 유전적 변이는 쌀 식물의 배유에서의 SBEIIa 및 SBEIIb 단백질 및/또는 활성의 수준의 감소를 초래하는 것인 방법.

#### 청구항 27.

제24항 내지 제27항 중 어느 하나의 항에 있어서, 유전적 변이를 도입하는 단계는 외인성 핵산을 도입하는 것을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 28.

제27항에 있어서, 외인성 핵산을 쌀 세포에 도입한 후, 이를 쌀 식물로 재생시키는 것인 방법.

#### 청구항 29.

제28항에 있어서, 외인성 핵산은 SBEIIa 및/또는 SBEIIb 발현 및/또는 활성의 억제제를 암호화하는 것인 방법.

#### 청구항 30.

제29항에 있어서, 억제제는 안티센스, 보조억제, 리보자임 또는 2가닥 RNA 분자인 것인 방법.

#### 청구항 31.

제24항 또는 제25항에 있어서, 유전적 변이를 도입하는 단계는 화학작용제 또는 방사를 사용한 부모 쌀 식물 또는 종자의 돌연변이유발을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 32.

제25항 내지 제31항 중 어느 하나의 항에 있어서, 자손 쌀 식물은 *SBEIIa* 및/또는 *SBEIIb*에서의 무의미 돌연변이를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 33.

제25항 내지 제32항 중 어느 하나의 항에 있어서, SBEI 단백질 및/또는 활성의 수준에서의 감소를 초래하는 유전적 변이를 도입하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 34.

제24항 또는 제25항에 있어서, 자손 식물은 곡류 전분중의 아밀로스의 수준을 기준으로 하여 또는, 자손 식물의 배유중에서 SBEIIa 및/또는 SBEIIb 단백질 및/또는 효소의 수준의 감소를 기준으로 하여 동정하는 것인 방법.

### 청구항 35.

제24항 내지 제34항 중 어느 하나의 항에 있어서,  $Wx^a$  대립유전자를 쌀 식물에 도입하는 것을 더 포함하는 것인 방법.

### 청구항 36.

제35항에 있어서,  $Wx^a$  대립유전자는 교배에 의하여 도입하는 것인 방법.

### 청구항 37.

- a) 감소된 수준의 SBEIIa 단백질 및/또는 효소 활성을 갖는 종자를 돌연변이유발시키는 단계; 또는
- b) 감소된 수준의 SBEIIb 단백질 및/또는 효소 활성을 갖는 종자를 돌연변이유발시키는 단계; 또는
- c) 감소된 수준의 SBEIIa 단백질 및/또는 효소 활성을 갖는 식물을 감소된 수준의 SBEIIb 단백질 및/또는 효소 활성을 갖는 식물로 교배시키는 단계; 및
- d) 배유중의 SBEIIa 및 SBEIIb 단백질 및/또는 효소 활성 모두의 감소된 활성을 갖는 쌀 식물을 동정하는 단계를 포함하는, 배유중의 감소된 수준의 SBEIIa 및 SBEIIb 단백질 및/또는 효소 활성 모두를 갖는 쌀 식물의 생성 방법.

### 청구항 38.

제37항에 있어서, 쌀 식물을 동정하는 단계는 쌀의 *SBEIIa* 유전자 또는 *SBEIIb* 유전자에 연결된 분자 마커로 쌀 식물 모집단을 스크리닝하며, 연결된 분자 마커를 사용한 스크리닝으로부터 시그날의 존재 또는 부재를 기준으로 식물을 동정하는 것을 포함하는 방법.

### 청구항 39.

제37항에 있어서, 쌀 식물의 동정 단계는 쌀 식물의 모집단으로부터의 종자를 쌀의 SBEIIa 단백질 또는 SBEIIb 단백질을 결합시키는 항체로 스크리닝하고, 결합중인 항체의 존재 또는 부재에 기초하여 식물을 동정하는 단계를 포함하는 것인 방법.

### 청구항 40.

제1항 내지 제16항 중 어느 하나의 항에 의한 곡류로부터 전분을 추출하는 단계를 포함하는 변형된 쌀 전분의 생성 방법.

### 청구항 41.

감소된 수준의 SBEIIa 및 SBEIIb 단백질 및/또는 활성을 갖는 쌀 식물을 생성하기 위한, 2 이상의 외인성 핵산 분자중 적어도 하나는 쌀 *SBEIIa* 발현 및/또는 활성의 억제제를 암호화하고, 이중 적어도 다른 하나는 쌀 *SBEIIb* 발현 및/또는 활성의 억제제를 암호화하는 것인 2 이상의 외인성 핵산 분자의 용도.

#### 청구항 42.

제41항에 있어서, 억제제는 안티센스 분자, 보조억제 분자, 리보자임, 2가닥 RNA 분자 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택된 것인 용도.

#### 청구항 43.

동일하거나 또는 상이할 수 있는 쌀 SBEIIa의 억제제 및 쌀 SBEIIb의 억제제를 암호화하는 분리된 핵산 분자.

#### 청구항 44.

제43항의 분리된 핵산 분자를 포함하는 벡터.

#### 청구항 45.

제43항의 분리된 핵산 분자를 포함하는 세포.

#### 청구항 46.

제45항에 있어서, 쌀 세포인 것인 세포.

#### 청구항 47.

제43항의 분리된 핵산 분자를 포함하는 트랜스제닉 쌀 식물.

명세서

#### 발명의 분야

본 발명은 상대적인 아밀로스 함량이 높은 커널 전분을 갖는 쌀 식물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 배유층의 감소된 전분 분지 효소 IIa (SBEIIa) 활성을 갖는 쌀에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 과립 및 전분 및 이로부터 얻은 식료품 및 비-식료품에 관한 것이다.

#### 발명의 배경

곡물 전분은 2 가지 타입의 분자, 즉 아밀로스 및 아밀로펙틴을 포함한다. 아밀로스는  $\alpha$ -1,4 연결된 글루코시드 단위로 이루어진 거의 직쇄 분자인 반면, 아밀로펙틴은 직쇄를 연결하는  $\alpha$ -1,6 글루코시드 결합으로 많이 분지되어 있다.

고등 식물의 배유층의 전분의 합성은 4 가지의 중요 단계를 촉매화하는 효소 세트에 의하여 수행된다. 첫째, ADP-글루코스 피로포스포릴라제 (ADGP)는 G-1-P 및 ATP로부터 ADP-글루코스의 합성을 통하여 전분의 단량체 전구체를 활성화시킨다. 둘째, 활성화된 글루코실 공여체인 ADP-글루코스는 전분 신타제에 의한 기존의  $\alpha$ -1,4 연결된 쇠의 비-환원 말단으로 이동한다. 셋째, 전분 분지 효소 (SBE)는  $\alpha$ -1,4 연결된 글루칸의 부위의 분해를 통하여 분지점을 도입한 후, 분해된 쇠를 수용체 쇠로 이동시켜 새로운  $\alpha$ -1,6 연결을 형성한다. SBE는  $\alpha$ -1,6 연결을  $\alpha$ -폴리글루칸에 도입할 수 있는 유일한 효소이어서 아밀로펙틴의 형성에 있어서 중요한 역할을 한다. 마지막으로, 전분 탈분지 효소는 이들이 작용하는 기전이 규명되지는 않았으나, 일부 분지 연결을 제거한다. (Myers et al., 2000). 적어도 이들 4 개의 활성이 고등 식물에서의 정상적인 전분 과립 합성에 필요한 것이 명백하나, 각각의 4 가지의 활성의 다수의 이소형태는 고등 식물의 배유에서 발견되

며, 돌연변이 분석을 기초하여 각각의 이소형태에 대하여 (Wang et al., 1998a, Buleon et al., 1998) 또는 트랜스제닉 접근법을 사용한 유전자 발현 수준의 변형을 통하여 (Abel et al., 1996, Jobling et al., 1999, Schwall et al., 2000) 특징의 역할이 제안되어 왔다. 그러나, 전분 생합성에 대한 각각의 활성의 각각의 이소형태의 정확한 기여는 여전히 알려지지 않았으며, 이러한 기여는 종들 사이에서 크게 상이한지의 여부에 대하여서도 알려지지 않았다.

곡물 배유에서, ADP-글루코스 피로포스포릴라제의 2 가지의 이소형태가 존재하며, 이중 하나의 이소형태는 아미노플라스트에 그리고 다른 하나의 이소형태는 세포질에 존재한다. (Denyer et al., 1996, Thorbjornsen et al., 1996). 각각의 이소형태는 2 개의 소단위 유형으로 이루어진다. 옥수수에서의 수축형 (*sh2*) 유전자 및 파쇄성 (*bt2*) 돌연변이는 커다란 그리고 작은 소단위에서 각각 존재하는 병변을 나타낸다. (Giroux 및 Hannah, 1994). 4 가지 유형의 전분 신타제는 곡물 배유중에 존재하며, 전분 파립, 파립-결합 전분 신타제 (GBSS)에 독점적으로 편재되어 있는 이소형태, 파립 및 가용성 분획 사이에 분배된 2 종의 형태 (SSI, Li et al., 1999a, SSII, Li et al., 1999b) 및 가용성 분획인 SSIII에만 위치하는 제4의 형태가 있다. (Cao et al., 2000, Li et al., 1999b, Li et al., 2000). GBSS는 아밀로스 합성에 대하여 필수인 것으로 나타났으며 (Shure et al., 1983), SSII 및 SSIII에서의 돌연변이는 아밀로펙틴 구조를 변형시키는 것으로 나타났다. (Gao et al., 1998, Craig et al., 1998). 쌀 GBSS (납양) 유전자 서열은 문헌 [Wang et al., 1990]에 기재되어 있으며, 발현은 안티센스 방법에 의하여 억제된다. (Terada et al., 2000). 납양(waxy) 유전자는 배유 및 화분중에서 발현되지만, 기타의 쌀 기관에서는 발현되지 않는다. (Hirano 및 Sano, 2000).

식물에서는 2 가지의 주요 유형의 SBE, 즉 SBEI 및 SBEII가 공지되어 있다. SBEII는 곡물에서 2 가지 타입, 즉 SBEIIa 및 SBEIIb로 추가로 특성화될 수 있다. (Boyer 및 Preiss, 1978; Gao et al., 1996; Fisher et al., 1996; Hedman 및 Boyer, 1982; Mizuno et al., 1992; Sun et al., 1997; Sun et al., 1998). 또한, 추가의 SBE 형태는 몇몇의 곡물에서 보고되고 있는데, 밀로부터의 추정치 149kDa SBEI (Baga et al., 2000) 및 보리로부터의 50/51kDa SBE (Sun et al., 1996)가 있다. 게놈 및 cDNA 서열은 쌀 (Nakamura 및 Yamanouchi, 1992; Mizuno et al., 1992; Mizuno et al., 1993; Mizuno et al., 2001), 옥수수 (Baba et al., 1991; Fisher et al., 1993; Gao et al., 1997), 밀 (Repellin et al., 1997; Nair et al., 1997; Rahman et al., 1997) 및 기타 곡물에 대하여 특정화되어 있다. 서열 정렬은 뉴클레오티드 및 아미노산 수준 모두에서 높은 정도의 서열 유사성이 밝혀졌으며, SBEI, SBEIIa 및 SBEIIb 유형으로 분류된다. SBEIIa 및 SBEIIb는 일반적으로 서로에 대하여, 특히 유전자의 중앙 부위에서 약 80% 서열 동일성을 나타낸다.

또한, SBEIIa, SBEIIb 및 SBEI는 이의 발현 패턴에 의하여 시간 및 공간 모두의 배유에서 그리고 기타의 조직에서 구별될 수 있다. SBEI는 밀 및 옥수수에서 중간-배유 성장 전방으로부터 발현된다. (Morell et al., 1997). 반대로, SBEIIa 및 SBEIIb는 배유 성장의 초기 단계로부터 발현된다. 옥수수에서, SBEIIb는 배유에서 주요한 형태인 반면, SBEIIa는 잎에서 높은 발현도로 존재한다. (Gao et al., 1997). 쌀에서, SBEIIa 및 SBEIIb는 대략 동일한 양으로 배유중에 존재한다. (Yamanouchi 및 Nakamura, 1992). 그러나, 발현의 타이밍 및 조직에는 차이가 있다. SBEIIa는 종자 성장의 초기 단계에서 발현되며, 개화후 일수 (DAF) 3일째에서 검출되며 잎에서 발현되지만, SBEIIb는 3 DAF에서는 검출되지 않으며, 7-10 DAF에서 발육중인 종자에서 가장 풍부하며, 잎에서는 발현되지 않는다. (Mizuno et al., 2001). 밀 배유에서, SBEI (Morell et al., 1997)는 가용성 분획에만 존재하는 반면, SBEIIa 및 SBEIIb는 가용성 분획 및 전분-파립 관련 분획 모두에서 발견된다. (Rahman et al., 1995).

2 가지 유형의 탈분지 효소는 고등 식물에 존재하며, 이의 기질 특이성에 기초하여 이소아밀라제 타입 탈분지 효소 및 풀룰라나제 타입 탈분지 효소를 정의한다. (Myers et al., 2000). 옥수수 및 쌀에서의 Sugary-1 돌연변이는 탈분지 효소 모두에서의 결핍과 관련되어 있으나 (James et al., 1995, Kubo et al., 1999), 통상의 돌연변이는 이소아밀라제-타입 탈분지 효소 유전자와 동일한 부위로 맵핑된다. 쌀에서, 이소아밀라제의 안티센스 억제는 아밀로펙틴 및 전분 특성의 구조를 변형시키는데 (Fujita et al., 2003), 이는 이소아밀라제가 아밀로펙틴 생합성에 필요하다는 것을 나타낸다.

곡물로부터 클로닝되는 대표적인 전분 분지 효소 유전자를 하기 표 1에 제시한다.

[표 1]

종	SBE 이소형태	쌀을 비롯한 클론 타입	곡물로부터 특성화된 전분 분지 효소 유전자	참조
			기탁 번호	
쌀	SBEI	cDNA	D10752	Nakamura 및 Yamanouchi, 1992
	SBEI	게놈	D10838	Kawasaki et al., 1993
	RBE3	cDNA	D16201	Mizuno et al., 1993
	RBE4	cDNA	AB023498	Mizuno et al., 2001



옥수수	SBEI	cDNA	U17897	Fisher et al., 1995
		게놈	AF072724	Kim et al., 1998a
	SBEIIb	cDNA	L08065	Fisher et al., 1993
		게놈	AF072725	Kim et al., 1998
	SBEIIa	cDNA	U65948	Gao et al., 1997
밀	SBEII	cDNA	Y11282	Nair et al., 1997
	SBEI	cDNA 및 게놈	AJ237897 및 SBEI 유전자) AF002821 (SBEI 위유전자) AF076680 (SBEI 유전자) AF076679 (SBEI cDNA)	Baga et al., 1999 Rahman et al., 1997 Rahman et al., 1999
	SBEI	cDNA	Y12320	Repellin et al., 1997
	SBEIIa	cDNA 및 게놈	AF338432 (cDNA) AF338431 (유전자)	Rahman et al., 2001
	SBEIIb	cDNA 및 게놈		W001/62934
	SBEIIb	cDNA		W000/15810
	SBEIIa 및 SBEIIb	cDNA 및 게놈	AF064563 (SBEIIb 유전자) AF064561 (SBEIIb cDNA) AF064562 (SBEIIa 유전자) AF064560 (SBEIIa cDNA)	Sun et al., 1998

옥수수 및 쌀에서, 높은 아밀로스 표현형은 아밀로스 증량제 (*ae*) 유전자로서 공지된 *SBEIIb* 유전자에서의 병변으로부터 생성되는 것으로 밝혀졌다. (Boyer 및 Preiss, 1981, Mizuno et al., 1993 ; Nishi et al., 2001). 이러한 *SBEIIb* 돌연변이에서, 배유 전분 곡류는 비정상적인 형태학을 나타내며, 아밀로스 함량은 크게 증가되며, 잔류 아밀로펙틴의 분지 빈도수는 감소되며, 단쇄의 비율 (<DP17, 특히 DP8-12)은 낮다. 또한, 전분의 젤라틴화 온도가 증가한다. 또한, 아밀로스 및 아밀로펙틴의 "중간"으로서 정의된 물질의 유의적인 풀율이 존재한다. (Boyer et al., 1980, Takeda, et al., 1993b). 쌀에서, *SBEIIb*의 불활성화로 인해서 약 18% 아밀로스를 포함하는 야생형 쌀에 비하여 약 25%인 아밀로스 함량을 생성한다. (Nishi et al., 2001).

반대로, 변이유발 (Mu) 삽입유전자 요소로 인하여 *SBEIIa* 단백질 발현에서 결핍된 *SBEIIa* 유전자에서의 옥수수 식물 돌연변이는 이들이 있 전분에서 변형된다 할지라도 배유 전분(Blauth et al., 2001)의 분지에서 야생형 식물로부터 식별이 불가능하다. 유사하게, *SBEIIa* 활성이 결핍된 쌀 식물은 배유중의 아밀로펙틴 쉼 프로파일에서 유의적인 변화가 없는 것으로 나타났다. (Nakamura 2002). 옥수수 및 쌀 모두에서, *SBEIIa* 및 *SBEIIb* 유전자는 게놈에서 연결되지 않는다.

옥수수의 매우 높은 아밀로스 변종은 한동안 알려져 있었다. 매우 높은 아밀로스 함량 (>90%)을 포함하는 LAPS (저 아밀로펙틴 전분) 옥수수는 *SBEII* 활성의 거의 완전한 불활성화와 함께 *SBEI* 활성에서의 상당한 감소에 의하여 이루어진다. (Sidebottom et al., 1998).

감자에서, 안티센스 방법에 의한 덩이줄기에서의 주요 SBE의 하향 조절 (*SBE B*, *SBEI*에 해당)에 의하여 일종의 신규한 전분 성질이 산출되지만, 이는 아밀로스 함량을 변경시키지는 않는다. (Safford et al., 1998). *SBE*의 덜 풍부한 형태의 안티센스 억제 (*SBE A*, 곡물에서의 *SBEII*에 유사함)에 의하여 아밀로스 함량이 38%로 적당히 증가한다. (Jobling et al., 1999). 그러나, *SBEII* 및 *SBEI* 모두의 하향 조절은 *SBEII* 단독의 하향조절보다 상대적 아밀로스 함량이 60~89%로 훨씬 더 많이 증가된다. (Schwall et al., 2000).

밀에서, SGP-1 (SSII) 단백질이 완전 결핍된 돌연변이는 아밀로펙틴 구조에서 변형되며, 변성된 전분 과립 및 약 30~37%의 전분으로 증가된 아밀로스 함량을 지니며, 이는 야생형 수준보다 약 8% 정도 증가된다. (Yamamori et al., 2000). 아밀로스는 비색 측정, 전류법 측정 (모두 요오드 결합에 대하여) 그리고 콘카나발린 A 방법에 의하여 측정한다. SSII 무의미(null) 돌연변이로부터의 전분은 등가의 비-돌연변이 식물로부터의 전분에 비하여 젤라틴화 온도가 감소된다. 곡류의 전분 함량은 야생형에서 60%로부터 50% 이하로 감소되었다.

옥수수에서, *dull1* 돌연변이는 배유중의 감소된 전분 함량 및 증가된 아밀로스 수준을 산출하며, 변화의 정도는 유전 배경 및 나머지 아밀로펙틴에서의 증가된 분지도에 의존한다. (Shannon 및 Garwood, 1984). 돌연변이에 해당하는 유전자는 전위유전단위 변이유발체 (Mu)를 사용한 전위유전단위-표지 전략에 의하여 동정 및 분리되며, 전분 신타제 II (SSII)로 표

기한 효소를 암호화하는 것으로 나타났다. (Gao et al., 1998). 효소는 곡물에서의 SSIII 과의 일원으로서 인지된다. (Li et al., 2003). 돌연변이 배유는 *dull1* 돌연변이와 관련된 감소된 수준의 SBEIIa 활성을 갖는다. 이러한 발견이 기타 곡물, 예를 들면 쌀과 관련된 것인지는 알려져 있지 않다.

곡류 전분에서의 증가된 비율의 아밀로스를 갖는 보리의 계가 동정되었다. 이는 상대적 아밀로스 함량이 약 45%인 고 아밀로스 Glacier (AC38) 및, 커널 전분중의 아밀로스가 약 65~70%로 증가된 보리의 *SSIIa* 유전자에서의 화학적 유도된 돌연변이를 포함한다. (WO02/37955 A1; Morell et al., 2003). 전분은 젤라틴화 온도가 감소된 것으로 나타났다.

쌀 (*Oryza sativa* L.)은 개발도상국에서 가장 중요한 곡물 작물이며, 넓은 지역에서, 특히 전세계의 약 90%를 아시아에서 생산하고 있다.

전분은 식품, 제지 및 화학 산업에서 널리 사용되고 있다. 전분의 물리적 구조는 식료품 및 비식료품 또는 공업 제품에 대한 전분의 영양 및 취급 특성에 대하여 상당한 영향을 미칠 수 있다. 특성의 성질은 아밀로펙틴 체 길이 분포, 결정화도 및 결정화 유형, 물성, 예컨대 젤라틴화 온도, 점도 및 팽윤 부피를 비롯한 전분 구조의 표시로서 취급될 수 있다. 아밀로펙틴 체 길이에서의 변화는 아밀로펙틴의 변형된 결정화도, 젤라틴화 또는 노화의 지수가 될 수 있다.

전분 조성, 특히 높은 아밀로스 함량과 관련될 수 있는 난소화성 전분으로 지칭되는 형태는 장 건강, 특히 대장 건강에 대하여 매우 중요한 의미를 갖는다. 따라서, 고 아밀로스 전분은 장 건강을 촉진하는 수단으로서 식료품에 사용하기 위한 옥수수 및 보리와 같은 특성의 곡류에서 개발되어 왔다. 난소화성 전분의 이로인한 효과는 장 미생물총이 발효되어 특히 단쇄 지방산을 형성하는 에너지를 제공하는 대장에 영양분을 제공하는 것에서 유래한다. 이러한 단쇄 지방산은 결장세포에 대한 영양분을 제공하며, 대장을 통하여 특성의 영양분의 섭취를 증가시키고, 결장의 생리적 활성을 촉진한다. 일반적으로 난소화성 전분 또는 기타의 식이 섬유가 제공되지 않을 경우, 결장은 대사가 상대적으로 불활성이 된다.

화학적으로 또는 개질된 전분을 비개질된 공급원에 의하여 정상적으로 제공되지 않는 기능성을 제공하는 식료품에 사용될 수 있으며, 이러한 과정은 변형에 관련된 과정으로 인하여 바람직하지 않은 이해를 지니거나 또는 중요한 기타의 성분을 변형시키는 경향을 갖는다. 그리하여, 식료품에서의 미개질 형태로 사용될 수 있는 성분의 공급원을 제공하는 것이 바람직하다.

그러므로, 아밀로스 비율이 40% 초과인 전분을 갖는 쌀은 알려져 있지 않다. 고 아밀로스 옥수수 및 보리 변종이 공지되어 있기는 하나, 매우 높은 아밀로스 쌀이 쌀 경작 지역에 바람직하다. 이러한 쌀로부터의 전분은 비교적 난소화성이며, 그리하여 매우 높은 아밀로스 쌀은 상당 부분의 세계 인구에게 중요한 건강상의 잇점을 줄 것으로 예상된다.

## 개론

당업자는 본 명세서에 기재된 발명이 구체적으로 기재된 것 이외에 변형에 및 수정에도 포함한다는 것을 숙지할 것이다. 본 명세서에 기재된 발명은 이러한 변형에 및 수정예를 모두 포함하는 것으로 이해하여야 한다. 또한, 본 발명은 본 명세서에서 언급되거나 또는 기재한 모든 단계, 특징, 조성 및 화합물 및, 임의의 2 이상의 상기 단계 또는 특징 중 임의의 것 및 모든 조합을 포함한다.

본 명세서를 통하여, 특별히 기재하지 않는 한, '포함한다' 및 이의 변형, 예를 들면 '포함하는' 및 '포함한'은 언급한 정수 또는 단계 또는, 정수 또는 단계의 군을 포함하는 것을 함축하는 것으로 이해하여야 하지만, 임의의 기타 정수 또는 단계 또는, 정수 또는 단계의 군을 배제하지 않는 것으로 이해하여야 한다. 본 발명은 단지 예시의 목적으로 제시한 본 명세서에 기재된 구체예에 의하여 범위를 제한하지 않는다. 작용적으로 등가인 생성물, 조성물 및 방법은 본 명세서에서 기재한 바와 같이 본 발명의 범위내에서 명백하다.

본 명세서에서 저자명이 언급된 문헌의 서지 사항은 발명의 상세한 설명의 후반부에 기재하였다. 본 명세서에서 언급한 참조 문헌은 본 명세서에서 참고로 인용한다. 1 이상의 종래 문헌을 비롯한 종래 기술의 참조는 승인 또는 암시로서 간주되어서는 아니되며, 이러한 종래 기술은 오스트레일리아에서 통상의 일반적인 지식에 해당하며, 오스트레일리아에서의 통상의 일반적인 지식의 일부를 형성한다.

본 명세서에서 사용한 바와 같이, 용어 '~로부터 유도된'은 특성의 정수 또는 정수의 군이 제시된 종으로부터 유래하는 것이며, 명시된 공급원으로부터 반드시 직접 얻을 필요는 없다는 것을 나타내는 것으로 간주되어야 한다.

본 명세서에서 언급한 뉴클레오티드 잔기의 표기는 IUPAC-IUB 생화학 명명법 규약에 의하여 권장되는 표기법으로서, A는 아데닌, C는 시토신, G는 구아닌, T는 티미딘을 나타낸다.

#### 발명의 개요

제1의 구체예에서, 본 발명은 곡류의 전분중의 아밀로스 비율이 40% 이상인 전분을 포함하는 쌀 식물로부터 얻은 곡류에 관한 것이다. 곡류는 SBEIIa 및 SBEIIb의 활성 또는 수준이 감소된 것이 바람직하며, 한 형태에서, 이는 2 이상의 유전적 변이에 의하여 달성되며, 여기서 하나의 유전적 변이는

- a) SBEIIa 발현 및/또는 활성을 억제하는 *SBEIIa* 유전자의 돌연변이 및
- b) SBEIIa 발현 및/또는 활성을 억제하는 도입된 핵산으로 구성된 군에서 선택되며,

2차 유전적 변이는

- a) SBEIIb 발현 및/또는 활성을 억제하는 *SBEIIb* 유전자의 돌연변이 및
- b) SBEIIb 발현 및/또는 활성을 억제하는 도입된 핵산으로 구성된 군에서 선택된다.

한 형태의 곡류는 트랜스유전자를 포함하며, 이 트랜스유전자는 안티센스, 보조억제, 리보자임 또는 2가닥 RNA 분자를 암호화할 수 있다. 또는, 곡류는 비-트랜스제닉일 수 있으며, 억제는 염색체 돌연변이 또는 재배치로부터 생성된다. 곡류는 *SBEIIa* 또는 *SBEIIb* 유전자의 무의미 돌연변이를 포함할 수 있다.

제1 구체예의 곡류는 감소된 수준의 SBEIIa 및 SBEIIb 단백질 및/또는 활성을 포함할 수 있다. 구체적인 형태에서, 곡류는 감소된 수준의 SBEI 단백질 및/또는 활성을 더 포함할 수 있으며, ADP 글루코스 피로포스포릴라제, GBSS, SSI, SSII, SSIII, 이소아밀라제 타입의 탈분지 효소 및 풀룰라나제 타입의 탈분지 효소로 구성된 군으로부터 선택된 변형된 수준의 단백질 및/또는 효소 활성을 추가로 또는 대안적으로 포함할 수 있다. 또다른 구체예에서, 곡류는 변형된 수준의 GBSS 단백질 및/또는 효소 활성을 포함한다. 추가의 구체예에서, 곡류는 인디카(*Indica*) 변종을 포함하거나 또는 *Wx<sup>a</sup>* 대립유전자를 포함한다.

바람직한 형태에서 곡류의 전분중의 아밀로스 비율은 50% 이상이다.

곡류는 비-수축형인 것이 바람직하며, 특정 형태에서, 평균 중량이 약 25 mg 이상이고, 바람직하게는 전분 함량이 증가의 그러나 변형되지 않은 곡류의 전분 함량의 90% 이상인 현미 형태이다. 곡류중의 전분 과립의 50% 이상이 편광하에서 관찰시 비-복굴절인 것이 바람직하다.

또한, 본 발명은 제2의 구체예에서 본 발명의 제1의 구체예의 곡류를 생성할 수 있는 쌀 식물을 포함한다.

본 발명의 제3 및 제4의 구체예는 본 발명의 제1의 구체예의 곡류로부터 추출한 전분 및 전분 과립에 관한 것이다.

제5의 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 제1의 구체예의 곡류로부터 생성된 밀가루 또는 전분을 포함하는 생성물에 관한 것이다. 이러한 생성물은 밀가루 또는 전분과 또다른 공급원으로부터의 밀가루 또는 전분의 혼합물을 포함할 수 있다. 이러한 생성물은 식료품 또는 비식료품이 될 수 있다.

본 발명의 제6의 구체예는 제3의 구체예의 전분 및 기타의 식료품 성분 또는 물을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 제7의 구체예는 곡류를 생성할 수 있는 쌀 식물을 생성하는 방법에 관한 것이며, 이러한 곡류는

- a) 유전적 변이를 부모 쌀 식물 또는 종자에 도입하는 단계; 및

b) 자손 식물의 곡류의 전분이 40% 이상의 아밀로스를 포함하는, 부모 쌀 식물 또는 종자의 자손 식물을 동정하는 단계를 포함하는, 40% 이상의 아밀로스를 포함하는 전분을 포함한다. 유전적 변이는 쌀 식물의 배유중의 SBEIIa 및 SBEIIb 단백질 수준 및/또는 활성을 감소시키는 것이 바람직하다.

이러한 방법의 자손 쌀 식물은 2 이상의 유전적 변이를 포함하는 것이 바람직하며, 여기서 하나의 유전적 변이는

a) SBEIIa 발현 및/또는 활성을 억제하는 *SBEIIa* 유전자의 돌연변이 및

b) SBEIIa 발현 및/또는 활성을 억제하는 도입된 핵산으로 구성된 군에서 선택되며,

2차 유전적 변이는

c) SBEIIb 발현 및/또는 활성을 억제하는 *SBEIIb* 유전자의 돌연변이 및

d) SBEIIb 발현 및/또는 활성을 억제하는 도입된 핵산으로 구성된 군에서 선택된다.

유전적 변이를 도입하는 단계는 외인성 핵산을 도입하는 것을 포함한다. 외인성 핵산은 쌀 세포로 도입된 후, 쌀 식물로 재생될 수 있다. 외인성 핵산은 SBEIIa 및/또는 SBEIIb 발현 및/또는 활성의 억제제를 암호화하며, 억제제는 안티센스, 보조 억제, 리보자임 또는 2가닥 RNA 분자인 것이 바람직하다.

또는, 유전적 변이를 도입하는 단계는 화학작용제 또는 방사선을 사용한 부모 쌀 식물 또는 종자의 돌연변이유발을 포함할 수 있다.

자손 쌀 식물은 *SBEIIa* 및/또는 *SBEIIb*에서의 무의미 돌연변이를 포함할 수 있다.

유전적 변이를 도입하는 단계는 추가로 SBEI 단백질 및/또는 활성의 수준에서의 감소를 추가로 초래할 수 있다.

자손 식물은 곡류 전분에서의 아밀로스 수준에 기초하여 또는 자손 식물의 배유중에서 SBEIIa 및/또는 SBEIIb 단백질 및/또는 활성의 수준의 감소에 기초하여 동정할 수 있다.

이러한 방법은  $Wx^a$  대립유전자가 쌀 식물로 도입되는 것을 더 포함할 수 있으며, 이는 교배에 의하여 도입될 수 있다.

본 발명의 제8의 구체예는 배유중의 SBEIIa 및 SBEIIb 단백질 및/또는 효소 활성 모두의 감소된 수준을 갖는 쌀 식물의 생성 방법에 관한 것으로서, 이는

a) 감소된 수준의 SBEIIa 단백질 및/또는 효소 활성을 갖는 종자를 돌연변이유발시키고; 또는

b) 감소된 수준의 SBEIIb 단백질 및/또는 효소 활성을 갖는 종자를 돌연변이유발시키고; 또는

c) 감소된 수준의 SBEIIa 단백질 및/또는 효소 활성을 갖는 식물들, 감소된 수준의 SBEIIb 단백질 및/또는 효소 활성을 갖는 식물로 교배시키고; 및

d) 배유중의 SBEIIa 및 SBEIIb 단백질 및/또는 효소 활성 모두를 갖는 감소된 활성을 갖는 쌀 식물의 동정을 포함한다.

이러한 쌀 식물을 동정하는 단계는 쌀 식물의 모집단을 쌀의 *SBEIIa* 유전자 또는 *SBEIIb* 유전자에 연결된 분자 마커로 스크리닝하는 단계 및, 연결된 분자 마커를 사용한 스크리닝으로부터의 시그날의 존재 또는 부재에 대하여 식물을 동정하는 단계를 포함할 수 있다.

이러한 쌀 식물을 동정하는 단계는 쌀 식물의 모집단으로부터의 종자를, 쌀의 SBEIIa 단백질 또는 SBEIIb 단백질을 결합시키는 항체로 스크리닝시키는 단계 및, 항체 결합의 존재 또는 부재를 기초로 하여 식물을 동정하는 단계를 포함할 수 있다.

또한, 본 발명은 전분을 본 발명의 제1의 구체예의 곡류로부터 추출하는 단계를 포함하는 변형된 쌀 전분의 생성 방법을 포함한다.

또한, 본 발명은 감소된 수준의 SBEIIa 및 SBEIIb 단백질 및/또는 활성을 갖는 쌀 식물을 생성하기 위한, 적어도 쌀 SBEIIa 발현 및/또는 활성의 억제제를 암호화하는 분자 및 적어도 쌀 SBEIIb 발현 및/또는 활성의 억제제를 암호화하는 분자인 2 이상의 외인성 핵산 분자의 용도에 관한 것이다. 억제제는 안티센스 분자, 보조억제 분자, 리보자임, 2가닥 RNA 분자 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

또한, 본 발명은 동일하거나 또는 상이한 분자일 수 있는 쌀 SBEIIa의 억제제 및 쌀의 SBEIIb의 억제제를 암호화하는 분리된 핵산 분자에 관한 것이다. 분리된 벡터는 벡터가 될 수 있다. 본 발명은 쌀 세포인 것이 바람직한 분리된 핵산 분자를 포함하는 세포에 관한 것으로 이해하여야 한다. 또한, 본 발명은 분리된 핵산 분자를 포함하는 트랜스제닉 쌀 식물을 포함하는 것으로 이해하여야 한다.

#### 도면의 간단한 설명

- 도 1. 쌀 전분 분지 효소 I 유전자 (SBEI)를 암호화하는 cDNA의 서열 - 진뱅크 수탁 번호 D11082 (서열 번호 1).
- 도 2. 쌀 전분 분지 효소 IIa 유전자 (SBEIIa)를 암호화하는 cDNA의 서열 - 진뱅크 수탁 번호 AB023498 (서열 번호 2).
- 도 3. 쌀 전분 분지 효소 IIb 유전자 (SBEIIb)를 암호화하는 cDNA의 서열 - 진뱅크 수탁 번호 D16201 (서열 번호 3).
- 도 4. pBC SK-로 삽입된 쌀 SBEI 유전자의 인트론 9의 500bp 분절을 포함하는 플라스미드 pRint9\_BC의 개략도.
- 도 5. 2가닥-RNA 작제물 A의 개략도. 사용한 유전자 요소의 순서는 프로모터, 센스 배향에서의 SBEIIa 또는 SBEIIb cDNA 서열, 인트론 (Rint9), 안티센스 배향에서의 SBEIIa 또는 SBEIIb cDNA 서열 및 전사 종결인자/폴리아데닐화 서열이다. ds-SBEIIa 및 ds-SBEIIb 유전자의 전사물은 센스 및 안티센스 서열의 사이에서의 하이브리드화에 의하여 형성된 이중 가닥 영역을 갖는 "헤어핀" RNA 구조를 형성한다. GT 및 AG 뉴클레오티드에 의하여 경계를 형성하는 인트론 서열은 스플라이싱된다. pRBEI.IR (pBC SK-(센스/Rint9/안티센스))의 개략도를 도시한다. 또한, pRBEIIa.IR 및 pRBEIIb.IR의 해당 작제물도 생성하였다.
- 도 6. 플라스미드 벡터 pBx17casNOT의 개략도를 도시한다.
- 도 7. 쌀 SBEIIa (서열 번호 2) 및 쌀 SBEIIb (서열 번호 3) cDNA 서열의 비교. 상부 서열 (상부 케이스)은 SBEIIb의 것이고, 하부 서열 (하부 케이스)은 SBEIIa의 것이다. 5' 및 3' 말단 서열은 충분한 수준의 동일성을 갖지 않기 때문에 도시하지 않는다.
- 도 8. 유전자 사일렌싱 작제물에 사용된 SBEIIa, SBEIIb 및 SBEI 3' 서열을 사용한 유전자 사일렌싱 프로그램으로부터의 BLAST 출력물이다.

#### 발명의 상세한 설명

##### 쌀 식물의 생성 방법

한 구체예에서, 본 발명은 곡류중의 변형 전분을 갖는, 특히 전분중의 아밀로스의 상대적 비율이 40% 이상 증가된 쌀 식물의 생성 방법을 제공한다. 본 명세서에서 정의한 바와 같은 전분중의 아밀로스 비율은 중량/중량 (w/w) 기준으로, 즉 전분의 중량비로서 아밀로스의 중량을 기준으로 한다. 전분중의 아밀로스 비율은 바람직하게는 적어도 45%, 50%, 55% 또는 60%, 더 더욱 바람직하게는 적어도 65%, 70% 또는 75%이다. 통상적으로 쌀에서, 전분중의 아밀로스 비율은 약 0~35%이다. 이러한 방법은 쌀의 배유중의 전분 분지 효소 IIa (SBEIIa) 및 전분 분지 효소 IIb (SBEIIb) 단백질 또는 효소 활성 모두의 수준이 감소되는 것을 포함할 수 있다. 단백질 또는 활성중의 감소는 비변형 쌀의 배유중의 단백질 또는 활성의 해당 수준에 비하여 40% 이상, 바람직하게는 60% 이상이 될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 적어도 75%, 더 더욱 바람직하게는 적어도 90% 또는 95%가 될 수 있다. 단백질 중 하나 또는 모두는 쌀 배유중에서 검출되지 않을 수 있다. 이러한 방법은 쌀

의 *SBEIIa* 및 *SBEIIb* 유전자의 발현을 변형시키는 것을 포함할 수 있거나 또는, 쌀중의 *SBEIIa* 및 *SBEIIb* 유전자, 또는 이들의 조합의 돌연변이를 포함하여 배유중의 *SBEIIa* 및 *SBEIIb* 활성 모두가 감소될 수 있다. 이들 유전자 중 하나 또는 둘다의 발현은 핵산, 예를 들면 트랜스유전자의 도입에 의하여 억제될 수 있다.

본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "증가된", "감소된", "변형된" 등은 해당 야생형 식물 또는 생성물과 비교하여 본 발명의 식물 또는 생성물에서의 차이를 언급하는 상대적인 용어를 의미하며, 이러한 야생형 타입 식물 또는 생성물은 본원 발명에 의하여 개질되지 않는 것이 명백하다.

아밀로스는 본 명세서에서  $\alpha$ -1,4 연결된 글리코시드 분자 및 아밀로스형 장쇄 아밀로펙틴 (종종 "중간 물질"로서 언급됨, Takeda et al., 1993b; Ferguson, 1994)으로 이루어진 실질적으로 선형인 분자를 포함하는 것으로 정의된다. 아밀로스 함량은 예를 들면 90% (w/v) DMSO중에서 크기 배제 HPLC를 비롯한 당업계에서 공지된 임의의 방법, 콘카나발린 A 방법 (메가자임 Int, 아일랜드), 또는 바람직하게는 요오드 방법에 의하여, 예를 들면 실시예 1에 기재된 바와 같은 방법의 의하여 측정할 수 있다. HPLC 방법은 전분의 탈분지 (Batey 및 Curtin, 1996)를 포함할 수 있거나 또는 탈분지를 포함하지 않을 수 있다. 곡류 중량 및 아밀로스 함량으로부터 곡류당 부착된 아밀로스의 함량을 트랜스제닉 및 대조용 라인에 대하여 계산 및 비교할 수 있다.

이러한 방법은 쌀 배유중의 *SBEIIa* 및/또는 *SBEIIb*, 바람직하게는 둘다의 활성을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 이는 예를 들면 면역검출에 의한 단백질의 수준 또는 당업계에 주지된 방법, 예를 들면 노던 블롯 하이브리드화 분석, 슬롯-블롯 하이브리드화, RNase 보호 분석, 마이크로어레이 분석 또는 역전사 폴리머라제 연쇄 반응 (RT-PCR)에 의한 해당 mRNA의 수준의 측정에 의하여 수행될 수 있다. 이러한 방법은 배유중의 감소된 *SBEIIa* 및/또는 *SBEIIb* 활성을 갖는 쌀 식물 또는 곡류에 대한 스크리닝 단계 또는 식물 또는 곡류의 선택 및 동정 단계를 더 포함할 수 있다. 스크리닝/선택 단계는 *SBEIIa* 및/또는 *SBEIIb* 활성 또는 단백질의 감소된 수준을 기초로 할 수 있거나, 또는 쌀 식물의 곡류의 표현형, 예컨대 증가된 비율의 아밀로스 또는 감소된 비율의 아밀로펙틴 또는 시각적 표현형, 예를 들면 수축형 곡류를 기초로 할 수 있다.

SBE 활성은 효소 분석, 예를 들면 포스포릴라제 자극 분석 (Boyer 및 Preiss, 1978)에 의하여 측정할 수 있다. 이러한 분석은 포스포릴라제 a에 의한 글루코스 1-포스페이트를 메탄올-가용성 중합체 ( $\alpha$ -D-글루칸)로 혼입하는 SBE에 의한 자극을 측정한다. SBE 활성은 글루칸 중합체의 분지로부터 생성된 글루칸-폴리요오드 착체의 흡광도의 감소를 측정하는, 요오드 염색 분석에 의하여 측정할 수 있다. 또한, SBE 활성은 이소아밀라제 소화에 이어서 기질로서 감소된 아밀로스로부터 감소된 말단의 생성을 측정하는 분지 연결 분석에 의하여 분석할 수 있다. (Takeda et al., 1993a). 바람직하게는, 활성은 SBEI 활성의 부재시 측정한다. SBE의 이소형태는 상이한 기질 특이성을 나타내며, 예를 들면 SBEI는 분지 아밀로스 중의 높은 활성을 나타내며, *SBEIIa* 및 *SBEIIb*는 아밀로펙틴 기질과의 높은 분지율을 나타낸다. 또한, 이소형태는 전환되는 글루칸 쇄의 길이에 기초하여 구별될 수 있다. 또한, SBE 단백질은 특이성 항체를 사용하여, 예컨대 본 명세서에서 설명된 것을 사용하여 측정할 수 있다. 바람직한 구체예에서, *SBEIIa* 및 *SBEIIb* 단백질 수준은 면역학적 방법, 예컨대 쌀 *SBEIIa* 및 *SBEIIb*의 N-말단 아미노산 서열에 해당하는 폴리펩티드 분자로 증가된 특이성 항체를 사용하는 웨스턴 블롯팅 또는 ELISA 분석에 의하여 측정한다. SBEII 활성은 곡류 성장중에 성장중인 배유중에서 또는 단백질이 여전히 등가의 그 러나 변형되지 않은 곡류중에 존재하는 성숙한 곡류중에서 측정될 수 있으며, 면역학적 방법에 의하여 분석할 수 있다.

추가 구체예에서, 본 발명은 곡류의 전분중의 아밀로스 비율이 40% 이상이 되도록 *SBEIIa* 및 *SBEIIb*의 활성의 감소와 조합하여 쌀중의 제3의 전분 생합성 효소의 활성을 변형시키는, 바람직하게는 감소시키는 방법을 제공한다. 또한, 배유중의 SBEI 활성은 감소되는 것이 바람직하다. *SBEIIa* 및 *SBEIIb*와 조합하여 변형될 수 있는 기타의 전분 생합성 효소 활성은 SSI, SSII, SSIII이다. 또한, 전분 탈분지 효소는 예를 들면 이소아밀라제 또는 풀룰라나제의 활성을 변형시킬 수 있다. 제3의 전분 생합성 효소 활성은 증가되거나 또는 감소될 수 있으며, 바람직하게는 미변형된 쌀중에서의 활성에 대하여 40% 이상, 바람직하게는 적어도 60% 또는 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%로 감소될 수 있다.

추가 구체예에서, 전분 생합성 효소의 활성은 배유 이외의 조직중의 식물에서 변형될 수 있으며, 예를 들면 SBEI 또는 SBEII, 바람직하게는 *SBEIIa*의 활성은 잎에서 증가되어 배유중의 *SBEIIa* 활성의 손실을 초래하는 식물중에서의 유전적 변이에 의하여 야기되는 활성의 약간의 손실에 대하여 보상할 수 있다. 이는 유전적 변이가 특히 배유중에서 뿐 아니라 기타의 조직에서도, 특히 잎에서의 *SBEIIa* 활성의 감소를 야기하는 경우 특히 바람직하다. 배유를 제외한 조직에서의 이러한 활성의 보상은 예를 들면 배유중에서 발현되지 않은 프로모터의 조절하에서의 효소 암호화 부위로부터 유래할 수 있는 것으로 이해한다. 이는 광합성-관련 유전자로부터의 프로모터, 예컨대 *rbcS7a* 될 수 있다. 또는, 배유중의 전분 합성은 배유중의 *SBEIIa* 및 *SBEIIb* 활성의 감소와 함께 1 이상의 전분 생합성 효소의 과발현에 의하여 추가로 개선될 수 있다. 이러한 효소를 암호화하는 유전자는 각종의 공급원, 예를 들면 박테리아 또는 쌀을 제외한 기타의 공급원으로부터 유래할 수 있으며, 예를 들면 효소의 온도 의존성의 변형 (WO94/09144)과 같은 촉매 성질을 변형시키기 위하여 개질될 수 있다.

고 아밀로스 표현형은 *SBEIIa* 및 *SBEIIb* 유전자의 발현에 부분 또는 완전 분열에 의하여 달성될 수 있다. 본 발명의 방법은 *SBEIIa* 및/또는 *SBEIIb* 유전자에서의 무의미 돌연변이를 갖는 쌀 식물 또는 곡류를 스크리닝 또는 동정 또는 선택하는 단계를 포함할 수 있다. "무의미 돌연변이"는 본 명세서에서 해당 식물 조직, 바람직하게는 배유에서의 검출 가능한 단백질 또는 효소 활성의 결핍을 초래하는 돌연변이로서 정의된다. 그러므로, 스크리닝/동정 단계는 유전자 수준에서의 스크리닝, 예를 들면 *SBEIIa* 및/또는 *SBEIIb*를 암호화하는 유전자에서의 결실에 대한 스크리닝, 또는 해당 유전자의 발현 수준에서의 스크리닝을 포함할 수 있다. 유전자를 억제하는 수준은 어느 정도는 쌀 곡류에서 생성된 전분의 성질을 결정하게 된다. 결실에 대한 스크리닝은 증폭 생성물의 적어도 일부가 해당 유전자의 적어도 일부로 뻗어 있도록 고안된 프라이머를 사용하는 PCR 증폭 방법에 의하여 수행될 수 있는 것이 편리하다. 개질된 쌀 배유로부터 추출된 단백질에 수행된 임의의 다양한 겔 전기영동 기법은 *SBEIIa* 및 *SBEIIb* 활성에 대한 변형의 성질 및 수준을 규명한다. 변형은 *SBEIIa* 및/또는 *SBEIIb* 활성에서의 감소 또는 배유중의 효소 활성의 완전 폐지로서 나타날 수 있다. 이러한 테스트를 수행하기 위하여 전분은 분석되는 내부의 쌀 배유 및 단백질로부터 추출될 수 있다. SDS-PAGE와 같은 기법이 공지되어 있는데, 면역블롯팅은 가용성 및 전분 과립 분획에 실시할 수 있으며, 변형이 *SBEIIa* 및 *SBEIIb* 효소에 발생하게 되는 식물 또는 곡류를 동정한다.

본 발명의 방법은 유전적 변이를 쌀 식물 또는 선조의 쌀 식물 또는 종자로 도입하는 것을 포함한다. 유전적 변이는 후술하는 바와 같은 트랜스유전자를 포함할 수 있거나 또는 돌연변이 유발, 예를 들면 화학적 돌연변이유발에 의하여 또는 방사선에 의하여 도입될 수 있다.

### 쌀 식물

추가된 구체예에서, 본 발명은 전분중의 아밀로스 비율이 40% 이상인 곡류를 생성할 수 있는 쌀 식물을 제공한다. 본 명세서에서 쌀 식물은 중 오리자 사티바 엘. (*Oryza sativa* L.)의 임의의 식물로서 정의된다. 쌀 식물은 오리자 사티바 엘.의 3가지의 인지된 중 중 임의의 것, 즉 자포니카 (Japonica) (또는 시니카), 인디카 (Indica) 및 자바니카 (Javanica)가 될 수 있으며, 인디카 변종인 것이 바람직하다. 각각의 종에는 다양한 품종 또는 변종이 있으며, 이들 모두는 본 발명의 식물에 포함된다. 바람직한 품종은 오스트레일리아에서 재배되고 있는 것, 예를 들면, 품종 아마루(Amaroo), 알리 콤보(Ali Combo), 바스마티(Basmati), 보간(Bogan), 봄비아(Bombia), 둔가라(Doongara), 굴라라(Goolarah), 일라봉(Illabong), 자라(Jarrah), 코시히카리(Koshihikari), 케에마(Kyeema), 랑기(Langi), 밀린(Millin), 나마지(Namage), 오푸스(Opus), 펠데(Pelde) 등이 있다. 아밀로스 비율은 바람직하게는 적어도 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75%이다. 쌀 식물은 배유중의 *SBEIIa* 및/또는 *SBEIIb* 발현 및/또는 활성을 억제시키는 1 이상의 유전적 변이를 포함한다. 유전적 변이는 임의의 유전적 변이가 될 수 있거나 또는 쌀 배유중의 *SBEIIa* 및 *SBEIIb* 활성 및/또는 단백질 모두에서의 감소를 초래하는 유전적 변이, 예컨대 *SBEIIa* 및 *SBEIIb* 유전자, 도입된 핵산, 예컨대 안티센스를 암호화하는 유전자, 개질된 안티센스, 보조억제, 리보자임, 2가닥 RNA 또는, *SBEIIa* 및/또는 *SBEIIb* 발현 또는 활성을 억제하는 유사 분자, 및 이들의 조합에서의 돌연변이의 조합이 있다. 유전적 변이는 무의미 돌연변이가 바람직하다. 감소된 *SBEIIa* 및 *SBEIIb* 활성을 갖는 식물은 *SBEIIa*에 대한 감소된 식물을 *SBEIIb*에 대한 감소된 식물로 교배시키거나 또는, *SBEIIa* 및 *SBEIIb* 유전자 모두의 발현을 억제시키는 분자를 암호화하는 트랜스유전자를 도입하여 생성될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 쌀 식물은 *SBEIIa* 및 *SBEIIb* 모두에서 무의미 돌연변이를 갖는다.

또한, 본 발명은 곡류의 발육중 적어도 일부분 동안 배유중의 감소된 수준의 *SBEIIa* 및 *SBEIIb* 활성 모두를 갖는 쌀 식물을 제공하며, 이러한 쌀 식물은 등가의 그러나 변형되지 않은 식물로부터 추출된 전분에 비하여 증가된 비율의 아밀로스를 포함하는 전분을 포함하는 곡류를 산출할 수 있다. *SBEIIa* 및 *SBEIIb*의 수준은 야생형에 비하여 바람직하게는 배유중에서 50% 이상, 더욱 바람직하게는 적어도 75%, 가장 바람직하게는 적어도 90% 또는 95%로 감소된다. 용어 "야생형"은 유전학 분야에서의 통상의 의미를 지니며, 본 명세서에서 교시된 바와 같이 변형되지 않은 쌀 품종 또는 유전형을 포함한다.

또한, 본 발명은 유전형 및/또는 표현형에서 부모 쌀 식물의 목적하는 성질을 갖는 자손 식물 및 곡류를 제공한다. 또한, 본 발명은 목적하는 성질, 예컨대 배양된 조직 또는 세포를 갖는 식물을 생성하는데 사용될 수 있는 쌀 식물의 임의의 증식 물질도 포함한다.

본 발명의 변형된 쌀 식물은 더욱 바람직한 유전 배경을 포함하는 식물로 교배될 수 있으며, 그리하여 본 발명은 기타의 유전 배경에서의 유전적 변이(들)을 포함한다. 초기 교배후, 덜 바람직한 배경을 제거하기 위하여 적절한 수의 역교배를 수행할 수 있다. 목적하는 유전 배경은 통상의 수율 및 기타의 성질, 예컨대 농경 성능 또는 무생물적 스트레스 저항을 제공하는 유전자의 적절한 조합을 포함할 수 있다. 또한, 유전 배경은 기타의 변형된 전분 생합성 또는 변형 유전자, 예를 들면 통상의 유전자가 알려지지 않은 수축형 배유를 갖는 기타의 쌀 라인으로부터의 유전자를 포함할 수 있다.

바람직한 구체예에서, 쌀 식물은 남양 유전자의  $Wx^a$  대립유전자를 포함한다. 이러한 대립유전자는 주로 쌀의 인디카 변종에서 발견되며,  $Wx^b$  대립유전자는 주로 자포니카 변종에서 발견된다.  $Wx^b$  대립유전자는 남양 유전자의 제1의 인트론의 5' 스플라이스 부위에서 치환 돌연변이 (GT 내지 TT)를 지녀서, 낮은 남양 유전자 발현을 생성하며, 그리하여  $Wx^a$  대립유전자를 포함하는 해당 식물에서보다 낮은 GBSS 활성 및 낮은 아밀로스 수준을 갖는다. (Issshiki et al., 1998 ; Hirano et al., 1998; Frances et al., 1998).

식물 또는 이로부터의 곡류는 트랜스제닉 또는 비-트랜스제닉일 수 있다.

## 곡류

본 발명은 등가의 그러나 변형되지 않은 쌀 식물로부터 추출한 전분에 비하여 변형된 전분을 포함하는 쌀 곡류를 제공한다. 곡류는 본 명세서에서 실질적으로 성숙한 곡류로서 정의된다. 곡류는 통상의 세팅으로 수확된다. 수확시, 쌀 곡류는 외피를 포함하는 미도정미의 형태 또는, 외피가 제거된 "현미"의 형태가 될 수 있다. 현미 분획만이 먹을 수 있다. 현미는 과피의 외층, 종피 및 배, 배종(배) 및 배유로 이루어진다. 본 명세서에서 정의된 바와 같은 배유는 부호분층 및 전분의 또는 내부 배유로 이루어진 적절한 배유 및 호분층으로 이루어진다. 현미는 과피, 종피, 종각, 호분층 및 배를 제거하여 실질적으로 전분의 배유를 포함하는 도정미를 생성하기 위하여 연마 또는 마찰 도정에 의하여 도정될 수 있다. 도정에 의하여 약간의 지방, 단백질, 섬유, 무기질 및, 티아민, 리보플라빈, 니아신 및  $\alpha$ -토코페놀을 비롯한 비타민을 포함하는 종피 및 호분의 성분 손실이 초래된다. 탄수화물 함량, 주로 전분은 현미에서보다 도정미에서 더 높다. 도정된 야생형 쌀 곡류는 약 77~89% 탄수화물, 6.3~7.1% 단백질, 1.5~1.7% 전분-결합된 및 비-전분 형태 모두를 포함하는 지질, 0.3~0.8% 무기질, 0.3~0.5% 미정제 섬유, 0.7~2.3% 중성세제 섬유를 포함하며, 약 10~15%의 수분을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 정의된 바와 같은 "쌀 곡류" 또는 단순히 "쌀"의 예로는 미도정미, 현미 및 도정미 등이 있으며, 도정미가 바람직하다.

본 발명의 쌀 곡류는 곡류가 유래하는 쌀 식물에 대하여 본 명세서에서 정의된 바와 같은 1 이상의 유전적 변이를 포함한다. 유전적 변이(들)는 쌀 곡류의 배유의 발육중에 SBEIIa 및 SBEIIb 활성 및/또는 단백질에서의 감소를 초래한다. 곡류는 등가의 그러나 변형되지 않은 식물로부터의 곡류에 비하여 증가된 비율의 아밀로스 (전체 전분의 비율로서) 및 감소된 비율의 아밀로펙틴을 포함한다. 전분은 건조 중량의 약 90%를 포함하는 도정미의 주요 성분이다. 본 발명에 의한 개질되지 않은 쌀의 배유 전분의 아밀로스 함량은 유전형에 따라서 0~37%가 된다. "겉보기 아밀로스 함량"을 측정하는 요오드 (비색) 분석에 의하면, 도정미는 남양질 (1~2% 아밀로스), 매우 낮은 아밀로스 (2~12%), 저 아밀로스 (12~20%), 중간 아밀로스 (20~25%) 및 고 아밀로스 (25~33%)로서 분류된다. (Juliano, 1979, 1985). HPLC 분석을 사용한 최근의 연구에 의하면, 최대의 전 아밀로스 함량은 약 20%이고, 추가의 요오드 결합은 아밀로펙틴중의 선형 장쇄로 인한 것으로 나타났다. (Takeda et al., 1987). 본 명세서에서 정의된 바와 같은 "아밀로스 함량" 또는 "겉보기 아밀로스 함량"은 당업계에서 주지되어 있는 바와 같은 요오드 방법, 예를 들면 문헌 [Morrison 및 Laignelet (1983)]에 기재된 분광법에 의하여 측정된다. 이는 기타의 방법, 예컨대 "전 아밀로스"만을 평가하는 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC, 예를 들면, Batey 및 Curtin, 1996) 방법은 본 명세서에서 정의된 바와 같은 아밀로스 함량을 과소평가할 수 있다는 것을 알 수 있다.

본 발명의 곡류는 40% 이상의 (w/w) 아밀로스를 포함하는 전분을 갖는다. 아밀로스 비율은 전체 전분의 바람직하게는 적어도 45%, 50% 또는 55%, 더욱 바람직하게는 적어도 60%, 더 더욱 바람직하게는 적어도 65%, 70%, 또는 75%이다. 바람직한 구체예에서, 곡류는 비-트랜스제닉이고, 이의 전분은 40% 이상의 아밀로스를 포함한다. 또한, 곡류는 감소된 수준의 SBEIIa 및 SBEIIb 단백질을 포함하며, 이의 전분은 40% 이상의 아밀로스를 포함한다. 증가된 아밀로스 수준은 비정상적인 전분 과립 형태학 또는 광학 현미경하에서 관찰시 또는 당분야에서 공지된 기타의 방법에 의하여 과립의 복굴절 손실로 입증될 수 있다.

바람직한 구체예에서, 쌀은 인디카 변종을 포함하며, 남양 유전자의  $Wx^a$  대립유전자를 포함한다.

곡류는 변형된 물성, 예를 들면 증가된 또는 감소된 젤라틴화 온도 및/또는 젤라틴화 도중에 및 젤라틴화 이후 변형된 팽윤 특성을 갖는 전분을 포함할 수 있다.

곡류는 수축형 또는 비-수축형일 수 있으며, 비-수축형 표현형이 바람직하다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "비-수축형"은 대부분의 곡류, 바람직하게는 적어도 90%의 각각의 곡류가 비대하거나 또는 완전 충전된 표현형을 나타내는 것으로 정의된다. 이는 통상적으로 정상의 또는 정상에 가까운 전분 축적 수준과 관련되어 있다. 반대로, 본 명세서에서 사용한 바와 같은 "수축형" 표현형, 특히 감소된 전분 축적을 갖는 대부분의 곡류, 특히 적어도 90%의 곡류를 의미한다. 약간 수축형



곡류는 평균 전분 함량이 적어도 30%로 감소된 것을 의미하며, 중간 수준의 수축형 곡류는 평균 전분 함량이 적어도 50%로 감소된 것을 의미하며, 높은 수축형 곡류는 평균 전분 함량이 적어도 70%로 감소된 것을 의미한다. 또한, 수축은 성숙한 곡류 중량의 비율로서 상대적인 전분 함량으로 측정될 수 있다. 야생형 현미 곡류 크기 및 형상에 대한 변수는 매우 긴, >7.50 mm; 긴, 6.61~7.50 mm; 중간, 5.51~6.60 mm; 짧은, <5.50 mm으로 정의될 수 있다. 곡류 형상은 길이-대-폭 비율을 기준으로 특정화될 수 있으며, 빈약한, >3.0; 중간, 2.1~3.0; 굵은 1.1~2.0; 및 둥근, < 1.0으로 정의된다. 이들 특징 각각은 본 발명의 쌀 곡류에서 변형될 수 있다.

또한, 본 발명은 밀가루, 가루 또는 기타의 곡류로부터 생성된 생성물을 제공한다. 이들은 가공하지 않거나 또는 예를 들면 분쇄법 또는 표백으로 가공할 수 있다. 본 발명은 본 발명의 쌀 식물로부터 얻은 식료품 제조에 유용한 쌀 곡류를 제공한다. 또한, 본 발명은 곡류를 도정, 분쇄, 압착, 진주상 처리, 거칠게 뿜기, 또는 동할 처리 또는 찌기 처리되도록 기타의 방법으로 가공된 곡류를 포함한다.

### 전분

또다른 구체예에서, 본 발명은 증가된 비율의 아밀로스 및 감소된 비율의 아밀로펙틴을 갖는 전술한 바와 같은 쌀 식물의 곡류로부터 얻은 전분 과립 또는 전분을 제공한다. 곡류를 얻은 식물은 배유층의 감소된 수준의 SBEIIa 및 SBEIIb 활성, 더욱 바람직하게는 SBEI의 활성을 갖는다. 또다른 구체예에서, 본 발명은 40% 이상의 아밀로스, 바람직하게는 적어도 45%, 50%, 55% 또는 60% 아밀로스, 더 더욱 바람직하게는 적어도 65%, 70%, 또는 75% 아밀로스를 포함하는 쌀 식물의 곡류로부터 얻은 전분 과립 또는 전분을 제공한다. 정제된 전분은 전분을 단백질, 오일 및 섬유로부터 분리하는 것을 포함하는 도정 과정, 예를 들면 습식 도정 과정에 의하여 곡류로부터 얻을 수 있다. 도정 과정의 초기 생성물은 전분 과립의 혼합물 또는 조성물이며, 그리하여 본 발명은 이러한 과립을 포함한다.

야생형 쌀의 전분 과립은 다면체의 형상을 지니며, 주로 크기가 3~9  $\mu\text{m}$ , 평균 5  $\mu\text{m}$ 이며, 크기 분포는 단일 모드이다. 단백질은 주로 배유를 통하여 크기가 구형 단백질체 0.5~4  $\mu\text{m}$ 인 형태로 나타난다.

전분은 증가되거나 또는 감소된 젤라틴화 온도, 바람직하게는 증가된 젤라틴화 온도를 지닐 수 있다. 젤라틴화 온도, 특히 제1 피이크의 개시 온도 또는 제1 피이크의 정점에 대한 온도는 유사하나 변형되지 않은 곡류로부터 추출된 전분에 대하여 DSC로 측정하여 적어도 3°C, 바람직하게는 적어도 5°C 또는 더욱 바람직하게는 적어도 7°C로 증가할 수 있다. 전분은 변형된 전분 과립 모폴로지를 갖는 이유로 인하여 소화성 효소의 물리적 접근 불가능성, 상당한 전분 관련 지질의 존재, 변형된 결정화도 및 변형된 아밀로펙틴 쇄 길이 분포로 이루어진 1 이상의 균을 비롯한 특이성 물성에 의하여 나타난 변형된 구조를 갖는 높은 수준의 난소화성 전분을 포함할 수 있다. 또한, 높은 비율의 아밀로스는 난소화성 전분의 수준에 기여하게 된다.

또한, 본 발명은 증가된 양의 식이성 섬유, 바람직하게는 높은 수준의 난소화성 전분과 조합된 섬유를 포함하는 예시된 쌀 식물의 곡류로부터의 전분을 제공한다. 또한, 이러한 증가는 적어도 부분적으로는 높은 상대적 수준의 아밀로스로 인한 것이다.

### 유전자 활성을 감소시키는 방법: 트랜스유전자

SBEIIa, SBEIIb 또는 기타의 전분 생합성 또는 변형 유전자의 활성은 유전적 변이를 쌀 식물에 도입하여 변형되는 것이 바람직하다. 이는 트랜스유전자를 쌀 식물로 도입하여 이루어질 수 있다. "유전적 변이"라는 것은 본 명세서에서 SBEIIa 및 SBEIIb 및 임의로 기타의 전분 생합성 또는 변형 유전자의 활성의 감소를 초래하며, 돌연변이, 예컨대 점 돌연변이, 치환, 역전, 중복, 전좌 및 바람직하게는 결실뿐 아니라, 트랜스유전자를 유전자 또는 조절 요소로 도입하는 것을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 유전적 변이는 예를 들면 역전, 중복, 전좌, 결실, 틀이동 또는 RNA 스플라이싱 돌연변이의 결과로서 무의미 돌연변이가 된다. 본 명세서에서 언급한 바와 같이 "트랜스유전자"는 재조합 DNA 또는 RNA 기법에 의하여 생성되거나 또는 변형된 그리고 해당 유기체 또는 세포로 도입되는 유전 서열을 포함한다. 트랜스유전자는 유기체 또는 세포로부터 유도된 유전 서열, 예를 들면 안티센스 서열을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 트랜스유전자는 본 명세서에서 정의된 쌀 SBEIIa 서열 또는 본 명세서에서 정의된 쌀 SBEIIb 서열의 보충의 적어도 19 개의 연속 뉴클레오티드와의 적어도 94% 동일성을 갖는 적어도 19 개의 연속 뉴클레오티드를 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 트랜스유전자는 통상적으로 쌀로부터 유도되지 않는 외인성 핵산을 포함한다. "트랜스제닉"은 트랜스유전자를 포함하는 쌀 식물 또는 곡류 또는 세포를 의미한다. "비-트랜스제닉"은 쌀 식물, 곡류 또는 세포의 게놈에서의 임의의 트랜스유전자의 부재를 의미한다. 트랜스유전자는 안정한 유전에 대하여 쌀 식물, 곡류 또는 세포의 게놈에 도입되는 것이 바람직하다.

안티센스, 개선된 안티센스, 보조억제, 리보자임, 2가닥 RNA 분자 등을 암호화하는 SBEIIa, SBEIIb 또는 기타의 전분 생합성 유전자 또는 유전자들을 비롯한 "유전자"에 대한 언급은 가장 넓은 범위에서 취급하여야 할 것이며, 이는 유전자의 암호화 영역 (즉, 엑손), 존재할 경우 전사되기는 하나 번역되지 않은 서열 및, 프로모터 및 전사 종결인자/폴리아데닐화 서열을 비롯한 조절 영역에 해당하는 mRNA 또는 cDNA뿐 아니라 게놈 유전자를 포함한다. 또한, 용어 "유전자"는 작용성 생성물의 전부 또는 일부를 암호화하는 합성 또는 융합 분자를 나타내는데 사용한다. 바람직한 유전자는 표준 재조합 기법에 의하여 천연 SBEIIa, SBEIIb 또는 전분 생합성 유전자로부터 유도된다. 일반적으로, 유전자는 단일 또는 복수의 뉴클레오티드 치환, 결실 및/또는 첨가를 생성하는 돌연변이유발로 처리한다. 이러한 유전자의 뉴클레오티드 삽입 유전자 유도체는 5' 및 3' 말단 융합뿐 아니라, 단일 또는 다수의 뉴클레오티드의 내-서열 삽입을 포함한다. 삽입유전자 뉴클레오티드 서열 변이체는 무작위 삽입이 생성된 생성물의 적절한 스크리닝과 함께 가능하기는 하나, 뉴클레오티드 서열에서의 소정의 부위로 1 이상의 뉴클레오티드가 삽입되는 것이다. 결실 변이체는 서열로부터 1 이상의 뉴클레오티드의 제거를 특징으로 한다. 치환 뉴클레오티드 변이체는 서열에서의 1 이상의 뉴클레오티드가 제거되고 상이한 뉴클레오티드가 이의 위치에 삽입된 것이다. 이러한 치환은, 치환이 코돈에 의하여 정의된 아미노산을 변경시키지 않는 "사일런트"가 될 수 있다. 또는, 치환체는 또다른 유사 작용 아미노산에 대한 1 개의 아미노산을 변경시키도록 한다. 통상의 보존 치환은 하기에 의하여 생성될 수 있다.

#### 아미노산 치환에 대한 적절한 잔기

##### 초기 잔기 예시 치환

Ala Ser

Arg Lys

Asn Gln; His

Asp Glu

Cys Ser

Gln Asn

Glu Asp

Gly Ala

His Asn; Gln

Ile Leu; Val

Leu Ile; Val

Lys Arg; Gln; Glu

Met Leu; Ile

Phe Met; Leu; Tyr

Ser Thr

Thr Ser

Trp Tyr

Tyr Trp; Phe

Val Ile; Leu

당업자는 세포에서의 유전자, 또는 이에 대한 상보적 서열의 발현이 프로모터 서열과 작동적으로 연결된 상태로 배치된 유전자를 필요로 한다는 것을 숙지하고 있을 것이다. 이러한 목적을 위한 프로모터의 선택은 필요한 발현 수준 및/또는, 발현이 발생하는 조직, 기관 또는 세포, 특히 배유 특이성 프로모터에 따라 달라질 수 있다.

프로모터 서열의 조절 제어하에서의 핵산 분자의 배치는 이러한 발현이 프로모터 서열에 의하여 제어되도록 상기 분자를 배치하는 것을 의미한다. 프로모터는 일반적으로, 그러나 반드시 그러한 것은 아니지만, 상류 또는, 이것이 조절되는 핵산 분자의 5'-말단에 있다. 또한, 프로모터를 포함하는 조절 요소는 일반적으로 유전자의 전사 개시 부위의 2 kb 이내에 위치한다. 이중 프로모터/구조 유전자 조합의 구성에서, 이의 천연 배치 (즉, 프로모터가 유래하는 유전자)에서 조절되는 프로모터 및 유전자 사이에서의 거리와 거의 동일한 유전자 전사 개시 부위로부터의 거리에서 프로모터를 배치하는 것이 일반적으로 바람직하다. 당업계에서 공지된 바와 같이, 이러한 거리에서의 약간의 변화는 프로모터 기능의 손실 없이 조절될 수 있다. 유사하게, 조절하에 배치하고자 하는 이중 유전자에 대한 조절 서열 요소의 바람직한 배치는 천연 배치 (즉, 이것이 유래하는 유전자)에서 요소의 배치에 의하여 정의된다. 또한, 당업계에서 공지된 바와 같이, 이러한 거리에서의 약간의 변화가 발생할 수 있다.

본 발명의 유전자 작제물에서 사용하기에 적절한 프로모터의 예로는 바이러스, 효모, 곰팡이, 박테리아, 곤충, 조류, 포유류 및 식물의 유전자, 바람직하게는 식물 세포에서 작용할 수 있는 것, 더욱 바람직하게는 쌀의 배유중에서 발현될 수 있는 것으로부터 유래한 프로모터 등이 있다. 프로모터는 발현이 발생하는 조직에 대하여 구조적으로 또는 차동적으로 발현을 조절할 수 있다. 또는, 발현은 발현이 발생하는 발육 단계에 대하여 또는 외부 자극, 예컨대 생리적 스트레스 또는 온도에 대하여 차동적일 수 있다.

SBEIIa 또는 기타의 전분 생합성 유전자 활성을 감소시키는 방법은 쌀의 재생 가능한 세포로의 트랜스유전자의 도입 단계 및 전환된 세포로부터 트랜스제닉 쌀 식물의 재생 단계를 포함할 수 있다. 아밀로펙틴의 합성에 관여하는 분지 효소로는 SBEI, SBEIIa 및 SBEIIb가 있으며, 트랜스유전자(들)는 이들 유전자 중 하나 이상을 불활성화시킬 수 있다. 또한, SBEIIb 및/또는 SBEI의 불활성화는 트랜스유전자 (예, 암호화하는 2가닥 RNA, 안티센스, 또는 리보자임 RNA, 하기 참조)가 *SBEIIb* 또는 *SBEI* 유전자 발현을 직접 표적화하는 것을 지시할 수 있거나 또는, *SBEIIb* 또는 *SBEI*의 발현에서의 감소를 간접적으로 초래할 수 있다. 예를 들면, 트랜스유전자 RNA는 서열 동일성 또는 염기쌍에서 *SBEIIa* 유전자/RNA만을 표적화할 수 있지만, 배유중의 단백질 안정화 또는 분포를 변형시킴으로써 SBEIIb 또는 SBEI 활성의 감소를 초래할 수 있다. 본 발명의 추가의 형태는 SBEIIa 및 SBEIIb의 감소된 활성 및 1 이상의 기타의 아밀로펙틴 합성 효소의 변형의 조합에 있으며, 이러한 효소는 SSII, SSII, SSIII, 및 탈분지 효소, 예컨대 이소아밀라제 또는 풀룰라나제 등을 포함할 수 있다. 이들 중 임의의 것 또는 전부의 발현은 트랜스유전자의 도입에 의하여 변형될 수 있다. 특징의 구체예에서, ADP-글루코스 피로포스포릴라제 (ADGP)는 쌀 식물에서 과발현되며, 이는 수율 및 성장을 개선시키는 것으로 나타났다. (Smidansky et al. 2003).

여러 개의 DNA 서열은 쌀에서의 아밀로펙틴 합성 유전자에 대하여 알려져 있으며, 이들 중 임의의 것은 쌀에서의 유전자의 불활성화에 대한 트랜스유전자를 디자인하기 위한 기초가 될 수 있다. 이들은 쌀 cDNA *SBEIIa* (진뱅크 수탁 번호 E14723, 일본 특허 출원 제1998-004970호), *SBEIIb* (D16201, Mizuno et al., 1993) 및 *SBEI* (D11082, Mizuno et al., 1992; D10752, Nakamura 및 Yamanouchi, 1992) 등이 있다. 쌀의 *SBEI* 유전자는 문헌 [Rahman et al., (1997) 및 Rahman et al., (1999), 또는 수탁 번호 D10838, Kawasaki et al., 1993]에 기재되어 있다. 또한, 유전자 서열은 웹사이트 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://www.tigr.org>; <http://www.gramene.org/about/index.html>로부터 얻을 수 있다.

또한, 밀, 보리, 옥수수 또는 기타 밀접하게 관련된 종으로부터의 유전자를 합성하는 *SBEIIa*, *SBEIIb* 또는 기타의 아밀로펙틴 동족체는 쌀에서의 유전자 발현 수준을 개선시키는데 사용될 수 있다. 이러한 유전자 또는 이의 분절은 표지된 프로브에 대한 하이브리드화 또는 PCR 증폭을 비롯한 당업계에서 주지된 방법에 의하여 얻을 수 있다. 트랜스유전자 작제물의 제조에 사용되는 동족체의 영역(들)은 적절한 영역내에서 해당 쌀 유전자에 대한 동일성 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90% 및 더 더욱 바람직하게는 95~100%를 지녀야 한다. 또한, 트랜스유전자는 쌀의 배유중에서 발현된 아밀로펙틴 합성 유전자를 특이적으로 표적화하고, 식물에서 아밀로펙틴 합성에 대한 적은 또는 최소의 영향을 미치는 것이 바람직하다. 이는 트랜스유전자에서의 적절한 조절 서열, 예컨대 배유-특이성 프로모터의 사용에 의하여 달성될 수 있다.

본 명세서에서 사용된 바와 같은 "엄격한 하이브리드화 조건"이라는 것은 하이브리드화가 프로브 및 표적 서열 사이에서의 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95% 서열 동일성이 있을 경우 발생하는 것을 의미한다. 엄격한 하이브리드화 조건의 예는 50% 포름아미드, 5×SSC (1×SSC = 150 mM NaCl, 15 mM 구연산삼나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 7.6), 5×Denhardt 용액, 10% 텍스트란 설페이트 및 20 µg/ml 변성 전단 담체 DNA, 예컨대 연어 정자 DNA를 포함하는 용액중에서의 밤새 항온배양에 이어서 0.1×SSC중에서 약 65°C에서 하이브리드화 지지물을 세정하는 것이다. 기타의 하이브리드화 및 세정 조건은 주지되어 있으며, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989), 특히 제11장]에 예시되어 있다.

## 안티센스

특히 식물에서의 변형, 특히 특이적으로 감소된 유전자 활성화에 대한 공지의 유전 공학 또는 트랜스제닉은 당업계에서 주지되어 있다. 유전적 변이를 쌀 식물에 도입하는 방법은 표적 유전자의 RNA에 대하여 상보적인 적절한 안티센스 분자의 발현을 포함하며, 이는 하이브리드화가 가능하다. 안티센스 분자는 표적 유전자의 mRNA의 번역 또는 가공 또는 안정도를 방해하여 이의 발현을 불활성화시킬 것으로 생각된다. 안티센스 서열을 고안하는 방법은 당업계에서 주지되어 있으며, 이들의 예는 미국 특허 제5,190,131호, 유럽 특허 명세서 제0467349-A1호, 유럽 특허 명세서 제0223399-A1호 및 유럽 특허 명세서 제0240208호에 기재되어 있으며, 이들은 본 명세서에서 참고로 인용한다. 식물에서의 안티센스 기법의 사용은 문헌 [Bourque (1995) 및 Senior (1998)]에 보고되어 있다. Bourque는 안티센스 서열이 어떻게 유전자 불활성화 방법으로서 식물계에 사용되는지에 대한 여러 가지의 예를 제시하였다. 또한, Bourque는 부분 역제가 계내에서 측정 가능한 변화를 생성할 것이기 때문에 임의의 효소 활성의 100% 역제를 달성하는 것이 반드시 필요하지 않은 것으로 설명하였다. Senior (1998)는 안티센스 방법이 유전자 발현을 조작하는 기존의 기법이라고 언급하였다.

쌀의 안티센스 분자 *SBEIIa*, *SBEIIb*, *SBEI* 또는 기타의 아밀로펙틴 생합성 유전자는 쌀 mRNA 서열에 기초하여 또는, 기타의 종, 예를 들면 보리로 부터 유도된 DNA 또는 mRNA 서열과의 상동성에 기초할 수 있다. 이들 안티센스 서열은, 유전자 발현 또는 스플라이싱 이벤트에 대한 제어에 영향을 미치는 서열에 대하여 또는 구조 유전자에 해당한다. 예를 들면, 안티센스 서열은 쌀 *SBEIIa* 또는 기타의 유전자의 표적화된 암호화 영역, 또는 5'-비번역 영역 (UTR) 또는 3'-UTR 또는 이들의 조합에 해당할 수 있다. 이는 부분적으로 인트론 서열에 상보적일 수 있으며, 이는 부분적으로는 전사중에 또는 전사 후에 스플라이싱될 수 있는 인트론 서열에, 바람직하게는 표적 유전자의 엑손 서열에만 상보적일 수 있다. UTR의 일반적으로 더 큰 집중성에 대하여, 이들 영역을 표적화하는 것은 유전자 역제의 더 큰 특이성을 제공한다. 안티센스 서열의 길이는 적어도 19 개의 인접 뉴클레오타이드, 바람직하게는 적어도 50 개의 뉴클레오타이드, 더욱 바람직하게는 적어도 100, 200, 500 또는 1,000 개의 뉴클레오타이드가 되어야 한다. 전체 유전자 전사에 상보적인 전장 서열을 사용할 수 있다. 길이는 가장 바람직하게는 100~2,000 개의 뉴클레오타이드이다. 표적화된 전사에 대한 안티센스 서열의 상동성의 정도는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90% 및 더욱 바람직하게는 95~100%이어야 한다. 안티센스 RNA 분자는 물론 분자를 안정화시키는 작용을 할 수 있는 관련이 없는 서열을 포함할 수 있다.

## 보조억제

사용 가능한 또다른 분자 생물학적 접근법은 보조억제이다. 보조억제의 기전은 완전히 규명된 것은 아니나, 후-전사 유전자 사일렌싱 (PTGS)을 포함하며, 그러한 점에서 안티센스 역제의 다수의 예와 매우 유사할 수 있는 것으로 생각된다. 이는 이의 발현에 대한 프로모터에 대하여 센스 배향에서의 식물에 유전자 또는 이의 분절의 여분의 복제를 도입하는 것을 포함한다. 센스 분절의 크기, 유전자 영역을 표적화하는 이의 대응 및 표적 유전자에 대한 상동성 정도는 전술한 안티센스 서열에 대한 것과 같다. 몇몇의 경우, 추가의 유전자 서열 복제는 표적 식물 유전자의 발현을 방해한다. 보조억제 접근법을 수행하는 방법에 대하여서는 특허 명세서 WO97/20936 및 유럽 특허 명세서 0465572를 참조한다.

## 이중 가닥 RNA-매개 유전자 사일렌싱

쌀 식물에 유전적 변이를 도입하는데 사용되는 추가의 방법은 2가닥 또는 이중 가닥 RNA 매개 유전자 사일렌싱이다. 또한, 이러한 방법은 PTGS를 포함한다. 이러한 방법에서, DNA가 도입되어 불활성화시키고자 하는 표적 유전자에 대한 상동성을 갖는 적어도 부분적으로 이중 가닥 RNA 생성물(들)의 합성을 지시한다. 그리하여, DNA는 센스 및 안티센스 서열 모두를 포함하며, RNA로 전사되었을 경우, 하이브리드화되어 이중 가닥 RNA 영역을 형성한다. 바람직한 구체예에서, 센스 및 안티센스 서열은 인트론을 포함하는 스페이서 영역에 의하여 분리되며, RNA로 전사될 경우 스플라이싱된다. 이러한 배치는 높은 효율의 유전자 사일렌싱을 생성하는 것으로 밝혀졌다. (Smith et al., 2000). 이중 가닥 영역은 하나의 DNA 영역 또는 2 개의 영역으로부터 전사된 1 또는 2 개의 RNA 분자를 포함할 수 있다. 이중 가닥 분자의 존재는 표적 유전자의 활성을 효과적으로 감소시키거나 또는 제거하는, 표적 식물 유전자로부터의 상동성 RNA 전사물 및 이중 가닥 RNA 모

두를 파괴하는 내인성 식물계로부터의 반응을 유발한다. 이러한 기법을 수행하는 방법에 대하여서는 오스트레일리아 특허 명세서 99/292514-A 및 특허 명세서 WO 99/53050를 참조한다. 하이브리드화하는 센스 및 안티센스 서열의 길이는 각각 적어도 19 개의 인접 뉴클레오타이드, 바람직하게는 적어도 30 개의 또는 50 개의 뉴클레오타이드, 더욱 바람직하게는 적어도 100, 200, 500 또는 1,000 개의 뉴클레오타이드이다. 전체 유전자 전사물에 해당하는 전장 서열을 사용할 수 있다. 길이는 100~2,000 개의 뉴클레오타이드인 것이 가장 바람직하다. 표적화된 전사물에 대한 센스 및 안티센스 서열의 상동성 정도는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90% 및 더욱 바람직하게는 95~100%이어야 한다. RNA 분자는 물론 분자를 안정화시키는 기능을 할 수 있는 관련이 없는 서열을 포함할 수 있다. RNA 분자는 RNA 폴리머라제 II 또는 RNA 폴리머라제 III 프로모터의 제어하에서 발현될 수 있다. 이의 예로는 tRNA 또는 snRNA 프로모터 등이 있다.

또한, 안티센스, 보조억제 또는 이중 가닥 RNA 분자는 대개는 이중 가닥 RNA 영역을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 PCT/AU03/00292에 기재된 바와 같이 핵 국소화 시그널을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 주로 이중가닥 영역은 PSTVd 타입 바이로이드로부터 유도되거나 또는 적어도 35 개의 CUG 트리뉴클레오타이드 반복부를 포함한다.

### 리보자임

리보자임은 쌀에서의 목적하는 유전자 발현의 불활성화에 관여하는 유전적 변이를 도입하는데 사용될 수 있다. 리보자임은 1개 또는 종종 2 개의 하이브리드화 서열에 의하여 정의되는 특이성 부위에서 기타의 RNA 분자를 분해할 수 있는 효소 또는 촉매 기능을 갖는 RNA 분자이다. RNA의 분해는 표적 유전자의 발현을 불활성화시킨다. 또한, 리보자임은 안티센스 분자로서 작용할 수 있으며, 이는 유전자 불활성화에 기여할 수 있다. 리보자임은 1 이상의 촉매 도메인을 포함하며, 바람직하게는 하이브리드화 서열 사이에서 헤어헤드 또는 헤어핀 타입을 포함한다. RNaseP, 그룹 I 또는 II 인트론, 및 간염 델타 바이러스 타입을 포함하는 기타의 리보자임 모티브를 사용할 수 있다. 유럽 특허 명세서 제0321201호 및 미국 특허 제 6,221,661호를 참고한다. 트랜스제닉 식물종의 유전자를 불활성화시키는 리보자임의 용도는 예를 들면 문헌 [Wegener et al., (1994)]에 예시되어 있다.

### 유전 작제물/벡터

본 발명은 RNA, 바람직하게는 유전자-억제 분자를 암호화하는 DNA를 포함하는 분리된 핵산 분자를 제공한다. 핵산 분자는 쌀 *SBEIIa* 및/또는 *SBEIIb* 유전자 서열을 표적화하며 쌀 곡류의 배유중의 발현을 불활성화시키는데 유효한 안티센스, 센스 (보조억제), 이중 가닥 또는 리보자임 분자를 암호화하는 것이 바람직하다. 또한, 본 발명은 1 이상의 조절 요소, 예컨대 프로모터, 인핸서 및 전사 종결 또는 폴리아데닐화 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자를 포함하는 유전자 작제물을 제공한다. 이러한 요소는 당업계에서 주지되어 있다. 유전자 작제물은 식물, 특히 단자엽 식물, 예컨대 쌀에서 트랜스유전자의 발현을 돕는 인트론 서열을 포함할 수 있다. 용어 "인트론"은 단백질을 전사시키지만 암호화하지는 않으며 그리고 번역 이전에 RNA를 스플라이싱하는 유전 분절을 의미하는 바와 같은 정상의 의미로 사용된다. 인트론은 트랜스유전자가 번역된 생성물을 암호화하는 경우 5'-UTR 또는 암호화 영역에서 또는, 암호화하지 않을 경우 전사된 영역 어느 곳에서나 혼입될 수 있다. 특징의 구체예에서, 배유-특이성 발현을 지시하는 인트론, 예컨대 보리 *SBEII* 유전자 인트론 (Ahlandsberg et al., 2002)을 사용한다.

본 발명은 벡터, 예를 들면 유전자 작제물을 포함하는 플라스미드 벡터를 추가로 제공한다. 용어 "벡터"는 시험관내 또는 생체내 발현이 가능한 발현 벡터 및, 하나의 세포 또는 유기체로부터 또다른 세포 또는 유기체로 전이될 수 있는 전환 벡터를 포함한다. 벡터는 세포, 예를 들면 원핵 세포, 예컨대 이. 콜리 (*E. coli*) 또는 아그로박테리움 (*Agrobacterium*)에서의 복제에 제공되는 서열을 포함한다. 바람직하게는, 벡터는 쌀 세포에 도입될 수 있는, 1 이상의 T-DNA 경계 서열에 의하여 정의되는 T-DNA 서열을 포함하는 바이너리 벡터이다. 본 발명은 재생 가능한 세포, 예컨대 미숙한 배 또는 배아 캘러스의 흡반의 세포일 수 있는 벡터, 예를 들면 아그로박테리움 (*Agrobacterium*) 또는 쌀 세포를 포함하는 세포를 추가로 제공한다. 또한, 세포는 트랜스유전자를 포함하는 전환된 쌀 세포가 될 수 있다.

### 프로모터/종결인자

본 발명의 트랜스유전자 또는 기타의 유전자 작제물은 쌀의 배유중의 조절된 또는 구성 발현이 제공될 수 있는 전사 개시 영역 (프로모터)을 포함할 수 있다. 프로모터는 배유중에서 선택적으로 또는 독점적으로 발현을 부여하는 조직 특이성일 수 있다. 프로모터는 배유-특이성 (예컨대 고 분자 중량 글루테닌 프로모터, 쌀 SSI 프로모터, 쌀 SBEII 프로모터, 쌀 GBSS 프로모터) 또는 배유에 대하여 특이성이 아닌 프로모터 (예컨대 유비퀴틴 프로모터 또는 CaMV35S 또는 개선했던 35S 프로모터)로부터 선택될 수 있다. 프로모터는 요인, 예컨대 온도, 광 또는 스트레스에 의하여 조절될 수 있다. 통상적으로, 프로모터는 발현시키고자 하는 유전 서열의 5'를 제공하게 된다. 또한, 작제물은 전사, 예컨대 nos 3' 또는 ocs 3' 폴

리아데닐화 영역 또는 전사 종결인자를 개선시키는 기타의 요소를 포함할 수 있다. 예시된 DNA 영역은 적절한 선택 가능한 마커 유전자 서열 및 기타의 요소를 포함하는 벡터에, 또는 이들 서열을 포함하는 벡터와 함께 공-전환되는 벡터에 혼입된다.

#### 쌀에 대한 전환 방법

쌀의 전환 방법, 즉 외인성 핵산의 도입에 의해 유전적 변이를 식물에 도입하기 위한 방법은 당업계에 주지되어 있으며, 예를 들면 문헌[Chan et al., 1993; Hiei et al., 1994; Zhang et al., 1997; Buchholz et al., 1998]을 참조한다. 전환은 당업계에서 공지된 바와 같이 적절한 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 균주에 의하여 또는 생물학적 탄도(biolytic) 방법에 의하여, 또는 쌀 원형질체로의 폴리에틸렌 글리콜 매개 제형수 등에 의하여 매개될 수 있다. 소정의 뉴클레오티드 서열 또는 유전자 작제물 및 선택 가능한 마커를 갖는 벡터는 조직 배양된 식물 또는 체외이식식물, 예를 들면 원형질체 또는 미숙한 배 또는 캘러스의 재생 가능한 쌀 세포로 도입될 수 있다. 선택 가능한 마커 유전자는 쌀 세포에 항생 또는 제초 내성을 제공할 수 있거나 또는, 성장에 대하여 기질, 예를 들면 만노스를 사용할 수 있도록 한다. 선택 가능한 마커는 쌀 세포에 제네티신, 하이그로마이신 또는 포스포노트리신 내성을 부여하는 것이 바람직하다. 재생 가능한 쌀 세포는 미숙한 배, 성숙한 배, 이들로부터 유도된 캘러스의 흡반, 또는 분열 조직으로부터인 것이 바람직하다. 전환된 세포를 선택한 후, 이를 당업계에서 주지된 방법, 예컨대 실시예 2에 기재된 방법에 의하여 재생하여 전환된 쌀 식물을 생성한다.

전환된 식물은 선택 가능한 마커 유전자를 포함할 수 있거나 또는, 이러한 유전자는 재생중에 또는 재생후 예를 들면 게놈으로부터의 선택 가능한 마커 유전자의 적출에 의하여 또는, *SBEIIa* 및/또는 *SBEIIb*의 역제를 초래하는 트랜스유전자로부터 선택 가능한 마커 유전자의 분리에 의하여 제거할 수 있다.

트랜스유전자 또는 돌연변이가 염색체로 혼입되는 식물에 예를 들면 트랜스유전자 또는 표현형 관찰에 대한 적절한 핵산 프로브 특이성을 이용하여 스크리닝할 수 있다. 임의의 여러 방법을 사용하여 전환된 식물의 존재를 검출할 수 있다. 예를 들면, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)을 사용하여 겔 전기영동 또는 기타의 방법에 의하여 증폭된 생성물의 검출과 함께 전환된 식물에 독특한 서열을 증폭시킬 수 있다. DNA는 전환된 및 비-전환된 식물을 구별하는 프라이머를 사용하여 수행한 통상의 방법 및 PCR 반응을 사용하여 식물로부터 추출할 수 있다. 예를 들면, 프라이머는 전환 벡터 판독으로부터의 DNA 영역을 작제물 및 해당 유전자로부터 고안된 역 프라이머를 증폭시키도록 고안될 수 있다. 이러한 프라이머는 식물이 성공적으로 변환된 경우, 분절을 단지 증폭시키게 된다. 양성 전환체를 확인하는 또다른 방법으로는 당업계에서 주지되어 있는 서던 블롯 하이브리드화에 의한 것이 있다. 또한, 변형된 식물 또는 돌연변이는 구별될 수 있으며, 즉 이의 표현형에 의한 비-전환 또는 야생형 식물로부터, 예를 들면 선택 가능한 마커 유전자의 존재에 의하여, 또는 면역학적 방법에 의한 특정 단백질의 존재에 의하여 또는, ELISA 분석 또는 웨스턴 블롯 분석에 의하여 검출되는 바와 같은 단백질, 예를 들면 배유층의 *SBEIIa* 단백질의 부재에 의하여 부여되는 것으로부터 구별될 수 있다. 또한, 이러한 식물을 스크리닝하는데 사용된 표시는 곡류의 표현형 성향의 관찰에 의하여, 예를 들면 수축형 곡류의 시각적 검사 또는 측정에 의하여 또는 증가된 아밀로스 함량에 대한 테스트 또는, 전분 과립의 복굴절의 존재에 대한 현미경 체크에 의하여 이루어질 수 있다.

#### 돌연변이

또한, 쌀 배유층에서의 *SBEIIa* 및 *SBEIIb* 효소 또는 기타의 전분 생합성 효소의 감소된 활성을 초래하는 유전적 변이의 도입은 유전자의 각각의 유전자 또는 조절 서열내에서의 적절한 돌연변이에 의하여 달성될 수 있다. 유전자를 억제하는 정도는 생성된 전분의 물성을 어느 정도로 결정한다. 돌연변이는 절단 또는 무의미 돌연변이가 될 수 있으며, 이는 전분의 성질에 상당한 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나, 변형된 전분 구조는 쌀의 전분 또는 곡류의 해당 물성을 제공하기 위하여 아밀로펙틴 합성 효소 활성을 충분히 감소시키는 누출 돌연변이로부터 생성된다. 또한, 기타의 염색체 재배열은 효과적일 수 있으며, 이들은 결실, 역전, 중복 또는 점 돌연변이를 포함할 수 있다.

돌연변이유발은 화학적 또는 방사 수단, 예를 들면 종자의 EMS 또는 나트륨 아지드(Zwar 및 Chandler, 1995) 처리, 또는 감마 방사에 의하여 달성될 수 있다. 감마 선 유도된 돌연변이의 경우, 종자는  $^{60}\text{Co}$  공급원(Zikiryayeva 및 Kasimov, 1972)으로부터의 20~50 kR 투여량에서 조사시킬 수 있다. EMS 돌연변이유발은 문헌[Mullins et al., (1999)]에 관하여 EMS (0.03%, v/v)를 사용한 종자를 처리하여 수행될 수 있다. 돌연변이의 분리는 돌연변이된 식물 또는 종자의 스크리닝에 의하여 달성될 수 있다. 예를 들면, 쌀의 돌연변이된 모집단은 곡류에서의 높은 아밀로스 함량에 대하여 및/또는 정상 아밀로펙틴 체 길이 분포보다 길고, ELISA에 의한 *SBEIIa* 및/또는 *SBEIIb* 단백질의 손실, 또는 변형된 곡류 모폴로지(Green et al., 1997)에 대하여 스크리닝할 수 있다. 스크리닝은 예를 들면 *SBEIIa*- 또는 *SBEIIb*-음성 배경중에서 SBE 활성 중 하나가 이미 결여되어 있는 쌀 유전형에서 수행되는 것이 바람직하다. 그리하여 이러한 돌연변이는 돌연변이와 소

정의 유전 배경의 식물과의 교배에 의하여 그리고 초기의 원치 않는 부모 배경의 교배를 위한 적절한 수의 역교배의 수행에 의하여 바람직한 유전 배경으로 도입할 수 있다. 바람직한 돌연변이는 쌀에서의 SBEIIa 및 SBEIIb 모두의 발현 또는 활성에 영향을 미치는 것이다.

그리하여, 본 발명은 고 아밀로스, 비-트랜스제닉 쌀 곡류 및 이로부터의 생성물을 제공한다.

아밀로펙틴 합성에 관여하는 SBEIIa, SBEIIb 또는 기타의 효소를 암호화하는 유전자, 예를 들면 증가된 수준의 GBSS에서의 돌연변이는 쌀 배유의 전분에서의 증가된 비율의 아밀로스를 제공한다. 각각의 곡류당 아밀로스의 함량은 아밀로펙틴으로부터 아밀로스로 전환된 탄소 흐름의 결과로서 증가될 수 있거나, 또는 곡류당 전분 생성에서의 상당한 감소가 존재할 경우 감소될 수 있다. 이러한 2 가지의 경우에서, 전분의 비율로서 상대적 수준의 아밀로스가 증가된다.

왜곡된 형상을 갖는 전분 과립의 종자는 고 아밀로스 보리 (Morell et al., 2003) 및 전분에서의 약 90%의 아밀로스를 갖는 저 아밀로펙틴 (LAPS) 옥수수 (Sidebottom et al., 1998)에서 보고되었다. 이러한 표현형은 쌀의 돌연변이된 모집단을 스크리닝하는데 사용될 수 있다. 또한, 복굴절은 이에 대하여 사용될 수 있다. 복굴절은 물질이 광을 2 가지 방향으로 굴절시키는 능력이며; 이는 편광 현미경으로 조망시 각각의 전분 과립에서 "말테스 십자형"으로 지칭되는 길은 십자형을 생성한다. 복굴절은 과립내에서 중합체의 규칙 구조 조직화 정도의 지수이다. (Thomas 및 Atwell, 1999). 전분 과립내에서의 복굴절의 손실은 일반적으로 증가된 아밀로스 함량과 상관 관계를 갖는다.

#### 식료품 생성에 적절함

또다른 구체예에서, 본 발명은 식료품 제조에 유용한 쌀을 제공하며, 곡류는 높은 상대적 아밀로스 함량 및 감소된 아밀로펙틴 함량을 포함하는 전분을 갖는다. 곡류를 얻는 쌀 식물은 발육중 배유중의 감소된 수준의 SBEIIa 및 SBEIIb 단백질 및/또는 활성을 갖는 것이 바람직하다. 본 발명의 쌀 식물은 식료품 제조, 특히 시판용의 식료품 제조에 유용하다.

쌀의 목적하는 유전 배경은 농경학적 수율 및 기타의 물성의 참작을 포함할 수 있다. 이러한 물성에는 농경학적 성능, 질병 내성 및 무생물적 스트레스 저항 등이 있다. 오스트레일리아에서는, 변형된 전분 성향을 쌀 품종, 예컨대 아마루, 알리 콤보, 바스마티, 보간, 봄비아, 둔가라, 굴라라, 일라봉, 자라, 코시히카리, 키에마, 랑기, 밀린, 나마지, 오푸스, 펠드 또는 기타의 일반적으로 재배되는 변종으로 교배하기를 원하고 있다. 제시된 예들은 오스트레일리아 재배 지역에 적절하며, 기타의 변종은 기타의 경작 지역에 적절하다. 본 발명의 쌀 변종은 적어도 일부의 경작 지역에서 해당 야생형 변종의 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 수율을 제공하는 것이 바람직하다. 수율은 제어된 현장 테스트에서 용이하게 측정될 수 있다.

곡류의 전분 함량은 적어도 약 25%, 바람직하게는 적어도 35% 또는 45%, 더욱 바람직하게는 55~65% (w/w)의 야생형 수준에 근접하여야 한다. 가장 바람직하게는, 곡류는 전분 함량이 증가의 그러나 변형되지 않은 쌀로부터의 곡류의 전분 함량의 90% 이상이다. 야생형보다 낮은 전분 함량은 감소된 아밀로펙틴 수준의 결과인 것으로 보인다. 더 낮은 전분 함량 조차도, 곡류는 시판중인 식료품 제조에 여전히 유용할 수 있는데, 이는 고 아밀로스 생성물의 비교적 높은 값으로 인한 것이다. 기타의 바람직한 물성은 곡류를, 특히 곡류 경도로 도정할 수 있는 용량을 포함한다. 더 높은 값을 갖는 쌀 식물을 생성하게 하는 또다른 구체예는 곡류로부터의 전분 추출도이며, 높은 추출율이 더욱 중요하다. 또한, 곡류의 형상은 식물의 상업적 유용성에 영향을 미칠 수 있는 또다른 측정이 되며, 그리하여 곡류의 형상은 곡류를 도정할 수 있는 용이성 등에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들면, 세장형 곡류 모폴로지는 도정 및 가공이 곤란할 수 있다.

전분은 표준 방법, 예를 들면 단백질을 제거하기 위하여 알칼리 용액 (수산화나트륨)을 사용한 브로커의 습식 도정을 사용하여 쌀 곡류로부터 용이하게 분리할 수 있다. 24 시간 동안 알칼리 용액중에서 파쇄립을 침지시킨 후, 이를 알칼리 용액을 사용하여 핀 도정기, 해머 도정기 또는 돌 도정기 봉해기에서 습식 도정한다. 반죽(batter)을 10~24 시간 동안 저장한 후, 스크린에 이를 통과시켜 섬유를 제거하고, 전분을 원심분리에 의하여 수집하고, 물로 철저히 세정하고 건조시켰다.

#### 변형된 전분의 물성

본 발명의 또다른 구체예에서, 쌀 전분은 시차 주사 열량법(DSC)에 의하여 용이하게 측정되는 변형된 젤라틴화 온도를 지닐 수 있다. 젤라틴화는 부수적으로 그리고 비가역적 물성의 변화, 예컨대 과립 팽윤, 결정체 용융, 복굴절 손실, 점도 증대 및 전분 가용화와 함께, 과량의 물중의 전분 과립내에서 분자 순서의 열 유도 붕괴 (파열)이다. 젤라틴화 온도는 잔류 아밀로펙틴의 쇠 길이에 따라서 야생형 식물로부터의 전분에 비하여 증가되거나 또는 감소될 수 있다. 옥수수의 *ae* (아밀로스

증량제) 돌연변이로부터의 고 아밀로스 전분은 보통의 옥수수보다 더 높은 젤라틴화 온도를 나타낸다. (Fuwa et al., 1999, Krueger et al., 1987). 반대로, 전분 신타제 IIa 활성이 결여된 보리 *sex6* 돌연변이로부터의 전분은 더 낮은 젤라틴화 온도를 지니며, 젤라틴화 피이크에 대한 엔탈피는 대조용 식물과 비교할 경우, 감소된다. (Morell et al., 2003).

변형된 젤라틴화 온도는 아밀로스 함량이 상대적으로 높을 수 있다. 야생형 쌀 전분의 젤라틴화 온도는 통상적으로 시차 주사 열량법에 의하여 측정시 개시 온도로서 정의되는 제1의 피이크의 온도에 대하여 약 61℃~67℃ (Rahman et al., 2000)이다.

또한, 전분은 야생형 전분에 비하여 가열된 과량의 물에서의 팽윤비를 특징으로 할 수 있다. 팽윤 부피는 통상적으로 전분 또는 밀가루를 과량의 물과 혼합하고, 이를 고온으로, 통상적으로 90℃보다 높은 온도로 가열시켜 측정한다. 그후, 샘플을 원심분리로 수집하고, 팽윤 부피는 침전된 물질의 중량을 샘플의 건조 중량으로 나눈 값이다. 낮은 팽윤 성질은 식료품 제조, 특히 수화된 식료품 제조에서의 전분 함량을 증가시키고자 하는 경우 유용하다.

본 발명의 소정의 형태를 갖는 쌀의 전분 구조는 쌀로부터 분리된 정상의 전분에 비하여 결정화도가 감소되었다는 점이 상이할 수 있다. 또한, 전분의 감소된 결정화도는 개선된 감각수용성과 관련된 것으로 생각되며, 이는 부드러운 맛에 기여하게 된다. 그리하여, 전분은 1 이상의 아밀로펙틴 합성 효소의 감소된 수준의 활성으로부터 생성된 감소된 결정화도를 추가로 나타낼 수 있다. 결정화도는 통상적으로 X-선 결정학으로 조사한다.

변형된 아밀로펙틴 구조의 측정은 전분의 쇄 길이의 분포 또는 중합도에 의한 것이다. 쇄 길이 분포는 이소아밀라제 탈분지후 형광발색단 보조 탄수화물 전기영동 (FACE)을 사용하여 측정할 수 있다. 본 발명의 전분의 아밀로펙틴은 탈분지의 야생형 식물로부터의 전분의 분포보다 더 큰 5~60의 쇄 길이 분포를 지닐 수 있다. 또한, 더 긴 쇄 길이를 갖는 전분은 분지의 빈도수에 있어서 적절히 감소된다. 그래서, 전분은 여전히 존재하는 아밀로펙틴에서의 더 긴 아밀로펙틴 쇄 길이 분포를 갖게 될 수 있다.

#### 식료품 물성

쌀 전분은 특히 아시아에서의 사람의 식이에서 주요한 탄수화물 공급원이며, 본 발명의 곡류 및 이로부터 유도된 생성물은 식료품을 제조하는데 사용될 수 있다. 식료품은 사람 또는 동물, 예를 들면 가축 사료에 또는 애완동물 사료에 의하여 소비될 수 있다. 변형된 쌀 식물로부터 유도된 곡류는 식료품 가공 절차에 용이하게 사용될 수 있으며, 그리하여 본 발명은 도정, 분쇄, 거칠게 뿜기, 동할 처리, 압착, 찌기 처리 또는 반숙 처리된 곡류 또는, 가루, 브로커, 쌀겨 및 쌀겨 기름을 비롯한 쌀 식물의 가공 곡류 또는 통 곡류로부터 얻은 생성물을 포함한다. 이러한 생성물은 조리된 쌀 또는 속성 조리된 쌀, 인스턴트 쌀, 과립 쌀, 젤라틴화 쌀, 캔 포장된 쌀 또는 쌀 푸딩 등이 될 수 있다. 곡류 또는 전분은 국수, 쌀 케이크, 라이스 페이퍼 또는 에그롤 랩퍼, 또는 발효 생성물, 예컨대 발효 국수 또는 음료, 예컨대 정종을 비롯한 가공 쌀 제품의 제조에 사용될 수 있다. 또한, 이로부터 유도된 곡류 또는 전분은 쌀 가루를 밀 또는 기타의 가루 또는 식품 첨가제, 예컨대 증점제 또는 결합제와 혼합하는 것을 포함하는 예를 들면, 빵, 케이크, 크래커, 비스킷 등에 사용될 수 있거나 또는, 드링크, 국수, 파스타 또는 즉석 스프의 제조에 사용될 수 있다. 쌀 제품은 밀을 포함하지 않는 식이에 사용되는 것이 적절하다. 곡류 또는 본 발명의 곡류로부터 유도된 생성물이 아침 식사용 곡물, 예컨대 팽화미, 라이스 플레이트에 특히 적절하거나 또는 압출된 생성물로서 사용하기에 적절하다. 본 발명의 고 아밀로스 전분은 제과 산업에 사용되는 것이 유용한 고 강도 겔을 형성하거나 또는 낮은 물딩 및 정화 시간이 소요되는데 사용할 수 있다. 이들은 예를 들면 딥 프라이드 포테이토 또는 기타의 식료품에서의 오일 흡수를 감소시키기 위한 코팅으로서 사용될 수 있다.

#### 식이 섬유

본 명세서에서 식이 섬유는 건강한 사람의 소장에서는 흡수되지 않고, 대장으로 유입되는 탄수화물 및 탄수화물 소화 산물이다. 이는 난소화성 전분 및 기타의 가용성 및 불용성 탄수화물 중합체를 포함한다. 이는 경주 미생물총에 의하여 대장에서 적어도 부분적으로 발효 가능한 탄수화물의 부분을 포함시키고자 한다.

본 발명의 전분은 비교적 높은 수준의 식이 섬유, 특히 아밀로스를 포함하는 것이 바람직하다. 본 발명의 곡류의 식이 섬유 함량은 상대적으로 증가한 배유 아밀로스 함량으로부터만 전적으로 유래하거나 또는 그렇지 않을 수 있다.

또한, 본 발명의 구체에는 높은 수준의 식이 섬유와 조합된 호분층 및 세균의 조합으로부터 생성된다. 특히, 이는 비교적 높은 수준의 호분 또는 세균이 곡류에 존재하는 것을 야기할 수 있다. 쌀 곡류가 약간 수축형인 경우, 배유는 감소된 함량으로 존재하며, 호분층 및 세균은 비교적 증가된 함량으로 존재한다. 그리하여, 쌀은 증가된 난소화성 전분과 조합된 비교



적 높은 수준의 특성의 유익한 요소 또는 비타민을 포함하며, 이러한 요소는 2가 양이온, 생체이용 가능한  $\text{Ca}^{++}$  및 비타민, 예컨대 엽산 또는 항산화제, 예컨대 토코페롤 또는 토코트리에놀을 포함한다. 도정한 생성물의 한 특이성 형태는 호분층이 도정한 생성물에 포함되는 것이 될 수 있다. 특정한 도정 과정은 도정한 생성물층의 호분층의 함량을 증가시키는 역할을 한다. 그래서, 호분층 및 세균을 포함하도록 도정되거나 또는 기타 가공된 곡류로부터 유도된 임의의 생성물은 별도의 공급원으로부터의 이들 요소를 첨가할 필요 없이 추가의 영양학적 잇점을 지니게 된다.

### 난소화성 전분

난소화성 전분은 건강한 사람의 소장에서는 흡수되지 않은 채 대장으로 유입되는 전분 및 전분 소화 산물의 총합으로서 정의한다. 그래서, 난소화성 전분은 소장에서 소화 및 흡수되는 산물은 제외한다. 난소화성 전분은 물리적 접근 불가능한 전분(RS1 형태), 난소화성 천연 전분 과립(RS2), 역행성 전분(RS3), 및 화학 변형된 전분(RS4)을 포함한다. 변형된 전분 구조, 특히 본 발명의 전분의 높은 아밀로스 수준은, 식료품중에서 소비될 경우 난소화성 전분에서의 증가를 초래한다. 전분은 RS1 형태일 수 있으며, 이는 다소 소화되기가 곤란하다. 또한, V-복합 결정화도에 의하여 측정된 바와 같은 전분-지질 결합은 난소화성 전분의 수준에 기여할 것으로 보인다.

본 발명의 한 잇점은 특성의 영양학적 잇점을 갖는 생성물을 제공하는 것이며, 또한 쌀 곡류의 전분 또는 기타의 성분을 수확후 변형시킬 필요가 없도록 하는 것으로 이해하여야 한다. 그러나, 곡류의 전분 또는 기타의 성분에 대한 변형이 이루어지도록 하는 것이 바람직할 수 있으며, 본 발명은 이러한 변형된 성분을 포함한다. 변형 방법은 주지되어 있으며, 난소화성 형태를 증가시키기 위한, 통상의 방법에 의한 전분 또는 기타의 성분의 추출 및 전분의 변형 등이 있다. 전분은 열 및/또는 습기를 사용한 처리, 물리적(예를 들면 볼 밀링), 효소적(예를 들면  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -아밀라제, 풀라라나제 등을 사용함), 화학적 가수분해(액체 또는 기체 시약을 사용한 습식 또는 건식), 산화, 2작용성 시약(예를 들면 트리메타인산나트륨, 옥시메타인)을 사용한 교차 결합, 또는 카르복시메틸화에 의하여 변형될 수 있다.

### 혈당 지수

혈당 지수(GI)는 전분을 포함하는 식료품의 소화율에 관한 것으로서, 이는 혈당 농도에서의 일탈에 대한 흰빵 또는 글루코스의 효과와 테스트 식료품의 효과의 비교치이다. 혈당 지수는 식후 상태 혈청 글루코스 농도에 대한 식료품의 가능성이 높은 수준 및 혈당 항상성에 대한 인슐린 요구의 측정치이다. 본 발명의 식료품에 의하여 제공되는 중요한 특성은 혈당 지수의 감소이다. 혈청 글루코스 수준은 저 아밀로스 쌀에 비하여 사람 지원자에 의한 고 아밀로스 쌀 생성물의 섭취후 30분에서 저하된다. (Goddard et al., 1984). 또한, 식료품은 낮은 수준의 최종 소화를 지닐 수 있으며, 그리하여 비교적 저 칼로리가 될 수 있다. 저 칼로리 제품은 도정미 곡류로부터 생성된 밀가루의 함유에 기초할 수 있다. 이러한 식료품은 포만감, 장 건강 증대, 식후 상태 혈청 글루코스 및 지질 농도를 저하시키고, 저 칼로리 식료품을 제공하는 효과를 지닐 수 있다.

### 비-식료품 응용에

본 발명은 임의의 각종의 산업적 요구치를 만족시키는 물성을 갖는 증가된 수준의 아밀로스 또는 감소된 수준의 아밀로펙틴을 포함하는 개질되거나 또는 개선된 전분을 제공한다. 전분은 필름, 종이, 직물, 골판지 및 접착제 산업(Young, 1984), 예를 들면 사이징제로서 비-식료품 산업에 널리 사용된다. 쌀 전분은 글루코스 시럽의 제조를 위한 또는 에탄올 제조를 위한 기질로서 사용될 수 있다. 미개질 전분의 물성은 특성의 적용에에서의 유용성을 제한하게 되며, 종종 비싸거나 또는 기타의 단점을 지닐 수 있는 화학적 변형에 대한 요구를 부가하게 된다. 본 발명은 특히 기타의 물성과 조합한 감소된 아밀로펙틴 함량으로 인한 더 적은 수확후 변형을 필요로 하는 전분을 제공한다. 예를 들면, 점도 증가 개시 온도, 전단 응력 저항, 필름 강도 및/또는 전분의 내수성 및, 본 발명의 곡류로부터 생성된 생성물을 변형시킬 수 있다. 또한, 전분은 폴리스티렌의 대체품 또는 기타의 포장재로서 사용할 수 있는 생분해성 루즈-필(loose-fill) 포장재를 제조하는데 사용할 수 있다.

본 발명의 구체예에 관한 여러 가지의 표시를 제시하면서, 본 발명은 본 발명의 2 이상의 구체예의 조합에 속하는 것으로 이해하여야 한다.

### 실시예

#### 실시예 1

#### 재료 및 방법

재료 및 배지

N6 다량 원소 (20×저장 용액)

g/l

$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  9.3

$\text{KNO}_3$  56.6

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  8

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3.7

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3.3

MS 다량 원소 (20×저장 용액)

g/l

$\text{NH}_4\text{NO}_3$  33.0

$\text{KNO}_3$  38.0

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.4

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  7.4

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  8.8

N6 미량 원소 (1000×저장 용액)

mg/100 ml

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  440

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  150

$\text{H}_3\text{BO}_3$  160

KI 80

MS 미량 원소 (1000×저장 용액)

mg/l

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  22300

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  250

$\text{H}_3\text{BO}_3$  6220

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8600

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  25

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  25

KI 830

B5 미량 원소 (100×저장 용액)

mg/ℓ

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1000

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  25

$\text{H}_3\text{BO}_3$  300

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  200

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  3.87

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2.5

KI 75

N6 비타민 (100×저장 용액)

mg/100 ml

글리신 20

티아민-HCl 10

피리독신-HCl 5

니코틴산 5

MS 비타민 (100×저장 용액)

mg/100 ml

미요-이노시톨 1000

티아민-HCl 1

피리독신-HCl 5

니코틴산 5

B5 비타민 (100×저장 용액)

mg/100 ml

글리신 1000

티아민-HCl 100

피리독신-HCl 10

니코틴산 10

MS 철 (200×저장 용액)

ml/500 ml

FeCl<sub>3</sub> (60% w/v) 2.7

MS Na<sub>2</sub>·EDTA (200×저장 용액)

g/500 ml

Na<sub>2</sub>·EDTA 3.7

1 ml의 무수 에탄올에 100 mg의 2,4-디클로로-펜옥시아세트산 (2,4-D)를 용해시키고, 3 ml의 1 N KOH를 첨가하고, 1 N HCl을 사용하여 pH를 6으로 조절하여 2,4-D (1 mg/ml, Sigma No. D-6679) 저장 용액을 제조하였다. 6-벤질 아미노 푸린 (1 mg/ml BAP, Sigma No. B-3408) 및 나프탈렌 아세트산 (1 mg/ml NAA, Sigma No. N-0640)의 용액을 제조하였다. 250 mg의 ABA를 2 ml의 1 M NaOH에 용해시키고, 이를 살균수를 사용하여 100 ml로 만들어 아브시스산 (ABA, 2.5 mg/ml, Sigma No. A-1049)을 제조하였다. 티오펜틴 (150 mg/ml, Smith-Kline Beecham 6571-30)은 3.1 g을 20.66 ml의 살균수에 용해시켜 제조하였다. 하이그로마이신 (50 mg/ml)은 로슈 (No. 843 555)로부터 얻었으며, 기타의 시약은 시그마로부터 얻었다.

캘러스 유탈을 위한 N6D 배지

함량/ℓ

N6 다량 원소 (20×) 50 ml

N6 미량 원소 (1000×) 1 ml

N6 비타민 (100×) 10 ml

MS 철 (200×) 5 ml

MS Na<sub>2</sub>EDTA (200×) 5 ml

미요이노시톨 100 mg

카사미노산 300 mg

프롤린 2.9 g

2,4-D (1 mg/ml) 2 ml

수크로스 30 g

1 M KOH를 사용하여 pH를 5.8로 조절하고, 1 ℓ당 3 g의 피토겔을 첨가하고, 혼합물을 오토클레이브로 처리하였다.

## 2차 배양을 위한 NB 배지

함량/ℓ

N6 다량 원소 (20×) 50 ml

B5 미량 원소 (100×) 10 ml

B5 비타민 (100×) 10 ml

MS 철 (200×) 5 ml

MS Na<sub>2</sub>EDTA (200×) 5 ml

2,4-D (1 mg/ml) 2 ml

수크로스 30 g

프롤린 500 mg

글루타민 500 mg

카제인 효소 가수분해 산물 (CEH) 300 mg

1 M KOH를 사용하여 pH를 5.8~5.85로 조절하고, 1 ℓ당 3 g의 피토겔을 첨가하고, 혼합물을 오토클레이브로 처리하였다.

## 2차 배양을 위한 MS 배지

함량/ℓ

MS 다량 원소 (20×) 25 ml

MS 미량 원소 (1000×) 1 ml

MS 비타민 (100×) 10 ml

MS 철 (200×) 5 ml

MS Na<sub>2</sub>EDTA (200×) 5 ml

수크로스 10 g

1 M KOH를 사용하여 pH를 5.8~5.85로 조절하고, 1 ℓ당 3 g의 피토겔을 첨가하고, 혼합물을 오토클레이브로 처리하였다.

NBO: NB 배지 및, pH 조절 이전에 첨가한 30 g/ℓ 만니톨 및 30 g/ℓ 소르비톨.

NBHT30: NB 배지 및, 오토클레이브 처리 이후 그리고 유동 직전에 첨가한 30 mg/ℓ 하이그로마이신 및 150 mg/ℓ 티넨틴.

NBHT50: NB 배지 및, 오토클레이브 처리 이후 그리고 유동 직전에 첨가한 50 mg/ℓ 하이그로마이신 및 150 mg/ℓ 티넨틴.

PRHT50: NB 배지 (2,4-D 없음) 및, 오토클레이브 처리 이후 최종 농도의 BAP (2 mg/ℓ), NAA (1 mg/ℓ), ABA (5 mg/ℓ), 하이그로마이신 (50 mg/ℓ) 및 티넨틴 (150 mg/ℓ)를 첨가함.

RHT50: NB 배지 (2,4-D 없음) 및, 오토클레이브 처리 이후 최종 농도의 BAP (3 mg/ℓ), NAA (0.5 mg/ℓ), 하이그로마이신 (50 mg/ℓ), 티넨틴 (150 mg/ℓ)를 첨가함.

MST 배지: MS 배지, 오토클레이브 처리 이후 0.05 mg/ℓ NAA 및 150 mg/ℓ 티넨틴을 첨가함.

### 쌀 전환

성숙한 곡류의 껍질을 벗기고, 1 분간 70% 에탄올에 침지하고, 살균수로 3회 세정한 후, 30 분간 50% 표백제에 침지시켰다. 살균한 곡류를 무균 조건하에서 살균수로 철저히 세정한 후, N6D 배지에 평판 배양하였다. 평판을 Micropore-테이프 로 밀봉하고, 26℃~28℃에서 캘러스 제조에 대하여 6~8 주간 광하에서 배양하였다. 아마도 곡류로부터의 배를 임의로 절개하지 않고 배의 흡반으로부터 유래한 캘러스가 생성되었다. 2차 배양이 필요한 경우, 캘러스를 NB 배지로 옮기고, 평판을 파라필름으로 밀봉하였다. 평판을 암실에서 28℃에서 알루미늄 호일로 싸인 박스내에 방치하였다. 매 4주마다 2차 배양을 실시하였다. 전환에 사용하기 전에 5회 이하로 캘러스를 2차 배양하였다.

아그로박테리움 (*Agrobacterium*) 매개 전환의 경우, 옮기고자 하는 유전자 작제물을 포함하는 아그로박테리움 (*Agrobacterium*) 균주를 적절한 항생제를 사용하여 평판에서 28℃에서 성장시키고, 2 일 후, 세포를 평판으로부터 긁어 내고, 이를 100 μM 아세트시린곤을 포함하는 액체 NB 배지중에 재현탁시켰다. 건강해 보이는 캘러스를 10 분간 박테리아 현탁액중에 침지시킨 후, 캘러스를 간단히 배수시키고, 암실에서 25℃에서 2 일간 100 μM 아세트시린곤을 포함하는 NBO 평판에 배치하였다. 이러한 기간 동안을 유전자 작제물을 포함하는 아그로박테리움 (*Agrobacterium*)의 존재하에서의 "공생 배양"으로 지칭한다. 공생 배양후, 캘러스를 150 mg/ℓ 티넨틴을 포함하는 살균수중에서 세정하고, 이를 간단히 건식 불꽃팅시키고, 150 mg/ℓ 티넨틴을 포함하는 NBHT30 (선택성 시약인 하이그로마이신을 포함함) 평판에 평판 배양하였다. 26℃~28℃에서 3~4 주후, 성장 구역을 나타내는 임의의 캘러스를 동일한 배지상에서 추가의 10~24 일간 2차 배양하였다. 지속된 성장은 하이그로마이신에 대한 내성을 갖는 캘러스, 즉 변환된 캘러스를 나타낸다. 이러한 캘러스는 티넨틴을 포함하는 NBHT50 평판에 옮기고, 26℃~28℃에서 암실에서 추가의 14~21 일간 배양하였다. 건강해 보이는 캘러스를 추가의 8~12 일간 암실에서 PRHT50 평판에 옮겼다. 마지막으로, 28℃에서 30 일 이상 동안 광하에서 RHT50 배지 상에서 싹이 재생되었다. 뿌리 형성을 나타내는 싹은 1/2 MST 배지로 옮기고, 충분히 커지면 온실의 흙으로 옮겼다. 이러한 방법은 자포니카 및 인디카 타입 모두를 포함하는 각종 쌀 품종에서 성공적인 것으로 입증되었다.

### 실시예 2

#### 유전자 하향조절에 대한 작제물 제조

쌀 *SBEI*, *SBEIIa* 및 *SBEIIb* 유전자의 분절을 쌀에서의 유전자 발현의 하향조절에 대한 유전자 작제물의 제조에 사용하기 위한 PCR에 의하여 증폭시켰다. 선택된 분절은, 이들 유전자 영역이 더욱 발산하기 때문에 유전자의 3' 말단에 근접한 엑손 영역으로부터 존재하며, 이는 전환된 쌀에서의 작제물에 의한 유전자의 교차-사일렌싱 가능성을 감소시킬 것으로 판단된다. 증폭된 분절은 진뱅크 수탁 번호 D 11082의 *SBEI*-뉴클레오티드 1982-2527; 수탁 번호 AB023498의 *SBEIIa*-뉴클레오티드 2458-2997; 수탁 번호 D16201의 *SBEIIb*-뉴클레오티드 2414 내지 2912 (도 1 내지 도 3에 도시된 서열)이다. 이후의 클로닝 단계에서 편의를 위하여 말단에서의 제한 엔도뉴클레아제 부위를 포함하는 추가의 서열을 포함한 증폭된 분절을 플라스미드 벡터 pGEM(등록상표)-T로 클로닝하였다. 또한, 인트론 서열은 쌀로부터의 *SBEI* 인트론 9 서열을 증폭하여 얻는다. 분절은 게놈 서열 진뱅크 수탁 번호 D10838 및 측면 *SpeI* 및 *EcoRI* 제한 부위의 뉴클레오티드 9112-

9606으로부터의 서열을 포함하며, pBCSK<sup>+</sup> (Stratagene)에 삽입하여 pRint9\_BC를 형성한다 (도 4). *SBEI*, *SBEIIa* 및 *SBEIIb* 유전자로부터의 엑손 분절을 각각 *SpeI/XbaI* 및 *XhoI/EcoRI* 부위를 사용하여 pRint9\_BC에서의 안티센스 및 센스 배향으로 클로닝하였다. 이는 이들 서열 각각에 대한 역전된 반복부를 형성하는 작용을 하며, 이들 각각은 인트론 서열에 의하여 분리된다. 생성된 플라스미드는 pRBEI.IR, pRBEIIa.IR 및 pRBEIIb.IR로 표기하였다 (도 5). 키메라 분절을 *BamHI* 및 *KpnI*로 절개하고, pBx17casNOT의 동일 부위에 삽입하였다 (도 6). 이는 발현에 대한 정확한 배향에서 안티센스/인트론/센스 키메라 분절을 Bx17 프로모터 영역 및 nos 3' 종결 영역에 연결하였다. 그후, 각각의 발현 카세트를 *HindIII* 및 *NodI*를 사용한 소화에 의하여 절개하고, 이를 박테리아에서의 선택을 위한 스펙티노마이신 내성 유전자뿐 아니라 식물 세포에서의 선택을 위한 식물 발현성 하이그로마이신 유전자를 포함하는 바이너리 벡터 pWBvec8 (Wang et al. Acta Hort 461: 401-407, 1998)로 삽입하였다. 작제물을 dsSBEI, dsSBEIIa 및 dsSBEIIb로 표기하였다. 그후, 이들 작제물을 전기천공에 의하여 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 균주 (AGL1) 세포 (Lazo et al. (1991))로 옮겼다.

추가 2가닥-RNA (dsRNA) 작제물이, 밀로부터의 해당 *SBEIIa* 유전자로부터의 서열을 사용하여 짝의 *SBEIIa* 및 가능한 *SBEIIb* 유전자의 발현을 감소시키도록 하였다. 상기의 기타의 작제물에 대하여, *SBEIIa* 유전자의 일부에 해당하는 소정의 핵산 서열은, 발현된 RNA가 염기쌍을 형성할 수 있는 상보적 영역을 포함하고 2가닥 또는 이중 가닥 RNA를 형성하도록 프로모터에 대한 센스 및 안티센스 배향 모두에서 발생하였다. 센스 및 안티센스 서열 사이의 스페이서 영역은 전환된 식물에서의 RNA의 일부로서 전사될 경우 단단한 '헤어핀' 2 가닥 구조를 형성하도록 스프라이징하는 인트론 서열을 포함한다. 인트론의 포함은 2가닥-RNA 작제물에 의하여 부여되는 유전자 사일렌싱의 효율을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. (Smith et al., 2000). 소정의 핵산은 밀로부터의 고분자량 글루테닌 (HMWG) 프로모터 서열 및 아그로박테리움 (*Agrobacterium*) (nos 3')으로부터의 노팔린 신타제 유전자로부터의 종결인자 서열에 연결된다. 이는 dsRNA 서열의 매우 특이성 발현을 제공한다.

SBEIIa 2가닥-RNA 작제물은 밀 *SBEIIa* 유전자로부터의 PCR에 의하여 증폭된 뉴클레오티드 서열의 1536bp를 포함한다. (진뱅크 수탁 번호 AF338431). 이는 엑손 1 및 2의 전부 및 엑손 3의 일부를 포함하는 468bp 서열을 포함하고, 양쪽에서의 *EcoRI* 및 *KpnI* 제한 부위 (분절 1), 양쪽에서의 엑손 3 및 4의 일부 및 *KpnI* 및 *SacI* 부위를 갖는 *SBEIIa*의 인트론 3의 전부로 이루어진 512bp 서열 (분절 2) 및 양쪽에서의 *BamHI* 및 *SacI* 부위를 갖는 *SBEIIa*의 완전 엑손 1, 2 및 3으로 이루어진 528bp 분절 (분절 3)을 포함한다. 사용된 서열은 더 짧은 영역 (50 개의 뉴클레오티드에 대하여 87% 및 27 개의 뉴클레오티드에 대하여 92%)에 대하여 더 큰 상동성을 포함하는 짝 *SBEIIa* 유전자 (SBE4)를 갖는 217 개의 뉴클레오티드에 대하여 80% 동일성을 가지며, 그리하여 짝 배유종의 이러한 서열의 발현은 짝 *SBEIIa*의 발현에서 크게 감소되는 것으로 기대된다. 또한, 밀 서열은 *SBEIIb*의 등가인 짝-분지 효소-3에 대한 113 개의 뉴클레오티드에 대하여 76% 동일하며, 이는 마찬가지로 이러한 전사물의 수준에 영향을 미칠 것으로 예상된다.

그후, 분절 1에 대한 안티센스 배향에서의 분절 2에 분절 3의 서열이 결합되도록 분절 1, 2 및 3을 결합시킨다. HMWG 프로모터 서열 및 nos 3' 종결인자를 포함하는 벡터 pBx17casNOT (도 6)에서 2가닥-RNA 작제물을 초기에 생성시킨다. 이러한 벡터내에서의 유전자 작제물은 pBx17ds-wSBEIIa로 표기하며, 2가닥-RNA 유전자는 ds-wSBEIIa로 표기하였다. 실시예 1에 기재한 바와 같이, ds-wSBEIIa 유전자를 포함하는 카세트를 pWBvec8로 삽입하고, 아그로박테리움 (*Agrobacterium*) 균주 AGL1으로 도입하고, 짝을 전환시키는데 사용하였다.

### 실시예 3

#### 감소된 SBE 활성을 갖는 짝의 제조

AGL1 세포종의 작제물 dsSBEI, dsSBEIIa, dsSBEIIb 및 ds-wSBEIIa를 사용하여 실시예 1에 기재된 방법에 따라 변형된 짝 식물 (cv. Nipponbare)을 생성하였다. 500 개의 짝 캘러스를 각각의 작제물에 사용하고, 변형된 캘러스를 선택하고, 짝 식물을 재생시켰다. 식물을 흙에 옮긴 후, 식물의 전환은 사용된 *SBEI*, *SBEIIa* 또는 *SBEIIb* 유전자 분절에 대한 프라이머 또는 프로브 특이성을 사용한 PCR 또는 서던 블롯 하이브리드화 분석에 의하여 입증하였다. ds-wSBEIIa를 사용한 전환으로부터의 24 개의 재생된 식물중에서, 21 개가 도입된 SBEIIa 서열에 대하여 양성을 나타냈다.

전환된 식물 (T1 종자)로부터의 곡류를 아크릴아미드 겔상의 배유 단백질의 겔 전기영동후 각각의 단백질에 대한 특이성 항체를 사용하는 웨스턴 블롯 분석에 의하여 SBE 단백질에 대하여 분석하였다. SBE 활성은 대부분의 전환된 라인에서 감소되었다. 곡류의 전분에서의 아밀로스 비율을 측정하였다. SBEIIa 전환된 라인의 일부는 상대적인 아밀로스 수준이 40% 이상, 이들 중 일부는 50% 초과로 나타났다. 아밀로스 비율은 SBEIIa 및 SBEIIb 활성 모두가 감소된 경우조차 증가하였다.

#### 실시예 4

##### 전분 및 단백질 분석

##### 탄수화물 결정 및 분석

말육중인 배유로부터 또는 문헌 [Takeda et al., (1986); Lumdubwong et al., (2000); Chiou et al., (2002) 또는 Schulman et al., (1991)]의 방법을 사용한 성숙한 곡류로부터 전분을 분리한다. 전분 함량은 메가자임 (Bray, Co Wicklow, 아일랜드 공화국)에서 공급되는 전체 전분 분석 키트를 사용하여 측정한다. 그후, 전분 함량을 대조용 식물과 비교하였다. 곡류의 전체 비-전분 함량을 얻기 위하여 전체 곡류 중량으로부터 전분 중량을 빼어 전체 중량에서의 감소가 전분 함량의 감소에서 비롯된 것인지를 결정한다.

전분 샘플의 아밀로스 함량은 문헌 [Morrison 및 Laignelet (1983)]의 비색법 (요오드법)에서 하기와 같이 약간 변형시켜 측정하였다. 뚜껑에 고무 와셔가 장착된 2 ml의 스크류캡이 있는 시험관에 약 2 mg의 전분을 정확하게 (0.1 mg까지 정확하게) 평량하였다. 지질을 제거하기 위하여 1 ml의 85% (v/v) 메탄올을 전분과 혼합하고, 시험관을 65°C로 수조에서 1 시간 동안 간헐적으로 흔들어 주면서 가열하였다. 13,000 g로 5 분간 원심분리한 후, 상청액을 조심스럽게 제거하고, 추출 단계를 반복하였다. 그후, 전분을 65°C에서 1 시간 동안 건조시키고, 2 mg의 전분 (전술한 바와 같이 평량함)당 1 ml의 UDMSO를 사용하여 우레아-디메틸 설폭시드 용액 (UDMSO; 9 부피의 디메틸 설폭시드 대 1 부피의 6 M 우레아)에 용해시켰다. 혼합물을 즉시 격렬히 흔들어 주고, 전분을 완전 용해시키기 위하여 간헐적으로 흔들어 주면서 95°C 수조에서 1 시간 동안 배양하였다. 물 1 ml당 2 mg 요오드 및 20 mg 요오드화칼륨을 포함하는 20  $\mu$ l의 I<sub>2</sub>-KI 제제로 전분-UDMSO 용액 (50  $\mu$ l)의 분액을 처리하였다. 혼합물을 물로 1 ml 이하로 만들었다. 650 nm에서의 혼합물의 흡광도는 미량평판으로 200  $\mu$ l를 옮기고, Emax Precision Microplate Reader (몰레cula 디바이스, 미국)을 사용하여 흡광도를 판독하였다. 0~100% 아밀로스 및 100%~0% 아밀로펙틴을 포함하는 표준 샘플을 감자 아밀로스 및 옥수수 (또는 감자) 아밀로펙틴 (Sigma)으로부터 생성하고, 이를 테스트 샘플에 대하여 처리하였다. 아밀로스 함량 (아밀로스 비율)은 표준 샘플에 대한 흡광도로부터 유래한 회귀 방정식을 사용한 흡광도 값으로부터 측정하였다. 또한, 비-탈분지된 전분의 아밀로스/아밀로펙틴 비율의 분석은 문헌 [Case et al., (1998)]에 의하여 또는 문헌 [Batey 및 Curtin (1996)]에 기재된 바와 같이 탈분지된 전분을 분리하기 위한 HPLC 방법에 의하여 수행할 수 있다.

전분에서의 채 길이의 분포는 전분 샘플의 탈분지후 문헌 [Morell et al (1998)]에 의한 모세관 전기영동 유닛을 사용한 형광발색단 보조 탄수화물 전기영동 (FACE)에 의하여 분석할 수 있다. 전분 샘플의 젤라틴화 온도 프로파일은 Pyris 1 시차 주사 열량계 (퍼킨 엘머, 미국 코네티컷주 노윅 소재)로 측정할 수 있다. 전분 용액의 점도는 예를 들면 문헌 [Batey et al., 1997]에서 보고한 바와 같은 조건을 사용하여 Rapid-Visco-Analyser (RVA, 뉴포트 사이언티픽 피티와이 리미티드, 오스트레일리아 시드니 워리우드 소재)로 측정할 수 있다. 측정 가능한 변수의 예로는 피이크 점도 (최대 고온 점도 증가 개시 점도), 지지 강도, 최종 점도 및 점도 증가 개시 온도 등이 있다. 가루 또는 전분의 팽윤 부피는 문헌 [Konik-Rose et al (2001)]의 방법에 의하여 측정할 수 있다. 물의 재흡수는 소정의 온도에서 물에 가루 또는 전분 샘플을 혼합하기 이전 및 이후 그리고 그 후의 젤라틴화 물질의 수집시 샘플의 중량을 평량하여 측정한다.

$\beta$ -글루칸 수준은 메가자임 (Bray, Co Wicklow, 아일랜드 공화국)에서 공급하는 키트를 사용하여 측정할 수 있다.

##### 배유중의 단백질 발현의 분석

배유중의 특이성 단백질 발현은 웨스턴 블롯 절차에 의하여 분석하였다.

배유를 약 0.2 mg의 모든 모성 조직 및 샘플로부터 절단하고, 5 mM EDTA, 20% 글리세롤, 5 mM DTT 및 1 mM Pefabloc을 포함하는 600  $\mu$ l의 50 mM KPi 완충액 (42 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 및 8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 7.5중에서 균질화시켰다. 분쇄한 샘플을 10 분간 13,000 g에서 10 분간 원심분리하고, 상청액을 분액으로 나누고, -80°C에서 사용할 때까지 냉동시켰다. 전체 단백질 평가를 위하여, BSA 표준 곡선을 0.25 mg/ml BSA 표준물질의 0, 20, 40, 60, 80 및 100  $\mu$ l 분액을 사용하여 설정하였다. 샘플 (3  $\mu$ l)을 증류수로 100  $\mu$ l로 만들고, 1 ml의 쿠마시 플러스 단백질 시약을 각각에 첨가하였다. 공시험으로서 표준 곡선으로부터의 제로 BSA 샘플을 사용하여 595 nm에서 5 분후 흡광도를 판독하고, 샘플중의 단백질 수준을 측정하였다. 각각의 배유로부터 20  $\mu$ g의 전체 단백질을 포함하는 샘플을 0.34 M Tris-HCl (pH 8.8), 아크릴아미드



(8.0%), 과황산암모늄 (0.06%) 및 TEMED (0.1%)를 포함하는 8% 비변성 폴리아크릴아미드 겔상에서 실시하였다. 전기영동후, 단백질을 문헌 [Morell et al., (1997)]에 의하여 니트로셀룰로스 막으로 옮기고, SBEIIa 또는 SBEIIb 특이성 항체로 면역반응시켰다.

#### 실시예 5

##### 쌀 게놈에서의 독특한 서열의 동정에 의한 표적 유전자의 최적화된 유전자 사일렌싱

예를 들면 2가닥 RNA, 안티센스 또는 보조억제 작제물을 사용한 방법에 의하여 표적 유전자 발현 (유전자 사일렌싱)을 감소시키는데 사용된 유전 서열은 표적 유전자에 대하여 특이성이 높은 것이 바람직하다. 즉, 사일렌싱 분자는 표적 유전자 또는 이의 보체의 19 개 이상의 연속 뉴클레오티드 서열에 대하여 약 95% 이상 동일한 19 개 이상의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 이상적으로 최대의 특이성에 대하여, 표적화된 서열은 표적 유전자에 대하여 유일하며, 식물 게놈에서의 발현된 유전자로서 존재하지 않는다. 이는 "오프(off)-유전자 효과"를 최소화한다. 본 출원인은 SBE 표적 유전자 서열을 이러한 유전자내에서의 최적화된 표적 서열을 동정하기 위한 쌀 게놈의 나머지와 비교하기 위하여 거의 완전한 쌀 게놈 서열의 지식을 사용하였다.

쌀 게놈 DNA 서열 데이터베이스 (OSAL seq)은 FASTA 포맷으로 TIGR 웹사이트 (<http://www.tigr.org/tdb/e2kl/osal/>)로부터 다운로드 가능하다. 데이터베이스를 포맷하고, "formatdb"를 사용한 BLAST 및 "dbfasta"를 사용한 EMBOSS 함수 seqret에 대하여 사용한다. 검색할 서열을 FATSFA 포맷으로 생성하고, 예비설정 변수 세트 (비교를 위한 사양: 단어 19 및 엄격도 18)를 사용한 BLAST 기준 유전자 사일렌싱 프로그램 (P. Waterhouse et al., CSIRO Plant Industry, 휴대 통신)를 가동시켜 쌀 게놈에서의 상동성 서열을 조사하는데 사용한다.

실시예 2에 기재된 바와 같은 유전자 사일렌싱 작제물을 제조하는데 사용된 SBEIIa, SBEIIb 및 SBEI 서열은 쌀 게놈에 대한 검색할 서열로서 사용한다. 출력물은 도 8에 도시하였다. 출력 서열에서의 다수의 'NNNN...'은 이들 영역내의 검색할 서열이 쌀 게놈에서의 서열을 갖는 19 개 이상의 연속 뉴클레오티드의 영역내에서 상동성을 갖는다는 것을 나타낸다. 사용한 SBEIIa 서열은 유일하며, 사용한 SBEIIb 서열은 특정의 비-유일 서열을 포함하며, 뚜렷하게 나타난 (도 8) 말단 57 개의 뉴클레오티드를 제외하고는 사용한 SBEI 서열은 쌀 게놈에서 중복되는 것으로 나타났다. 현행 쌀 게놈 서열은 SBEI 유전자 영역을 포함하는 2 개의 중복하는 BAC 클론 사이의 중복하는 게놈 DNA 서열인 것으로 밝혀졌다. 겹보기 중복이 실제로 존재할 수 있거나 또는 이러한 영역내에서 쌀 게놈의 어셈블리내에서의 오류로 나타날 수 있다.

#### 참고 문헌

- Abel et al., (1996). *The Plant Journal* 10, 981-991.
- Ahlundsberg et al., (2002). *Plant Cell Rep* 20, 864-868.
- Anderson et al., (1989). *Nucl Acids Res* 17, 461-462.
- Baba et al., (1991). *Biochem Biophys Res Commun* 181: 87-94.
- Baga et al., (2000). *Plant Physio.* 124, 253-263.
- Batey and Curtin, (1996). *Starch* 48, 338-344.
- Batey et al., (1997). *Cereal Chemistry* 74, 497-501.
- Blauth et al., (2001). *Plant Physiology* 125, 1396-1405.
- Bourque. (1995). *Plant Science* 105, 125-149.
- Boyer and Preiss, (1978). *Carbohydrate Research* 61, 321-334.
- Boyer and Preiss, (1981). *Plant Physiology* 67, 1141-1145.

- Boyer et al., (1980). *Starch* 32, 217-222.
- Buchholz et al., (1998). *Methods Mol Biol* 81, 383-396.
- Buleon et al., (1998). *International Journal of Biological Macromolecule* 23, 85-112.
- Cao et al., (2000). *Archives. of Biochemistry and Biophysics*. 373, 135-146.
- Case et al., (1998). *Journal of Cereal Science* 27, 301-314.
- Chan et al., (1993). *Plant Mol Biol* 22, 491-506.
- Chiou et al., (2002). *Starch* 54, 415-420.
- Craig et al., (1998). *Plant Cell* 10, 413-426.
- Denyer et al., (1996). *Plant Physiology* 112, 779-785.
- Ferguson. 1994. pp 55-77 in "Speciality Corns" eds, CRC Press Inc.
- Filipse et al., (1996). *Planta* 198, 340.
- Fisher et al., (1993). *Plant Physiol* 102 : 1045-1046.
- Fisher et al., (1996). *Plant Physiol* 110 : 611-619.
- Frances et al., (1998). *Plant Mol Biol* 38, 407-415.
- Fujita et al., (2003). *Plant Cell Physiol* 44, 607-618.
- Fuwa et al., (1999). *Starch/Starke*. 51, 147-151.
- Gao et al., (1996) *Plant Mol Biol* 30, 1223-1232.
- Gao et al., (1997). *Plant Physiol* 114 : 69-78.
- Gao et al., (1998). *Plant Cell* 10, 399-412.
- Giroux and Hannah. (1994). *Molecular and General Genetics* 243, 400-408.
- Goddard et al., (1984) *Am J Clin Nutr* 39, 388-392.
- Green et al., (1997). *Plant Physiology* 114, 203-212.
- Hedman and Boyer, (1982). *Biochemical Genetics* 20, 483-492.
- Hiei et al., (1994). *Plant J* 6, 271-282.
- Hirano et al., (1998). *Mol Biol Evol* 15, 978-987.
- Hirano and Sano, (2000). *Genes Genet Syst* 75, 245-249.
- Isshiki et al., (1998). *Plant J* 15, 133-138.

- James et al., (1995). *Plant Cell* 7, 417-429.
- Jobling et al., (1999). *Plant Journal* 18, 163-171.
- Juliano, B. O. (1979). in Proceedings, Workshop on Chemical Aspects of Rice Grain Quality, p. 69-90. Los Banos, Laguna, the Philippines, IRRI.
- Juliano, B. O., (1985). Rice: chemistry and technology, 2nd ed. St Paul, MN, USA, *Am Assoc. Cereal Chem.* 774 pp.
- Kawasaki et al., (1993). *Mol Gen Genet* 237,10-16.
- Konik-Rose et al., (2001) *Starch* 53, 14-20.
- Krueger et al., (1987). *Cereal Chemistry* 64, 187-190.
- Kubo et al., (1999). *Plant physiology.* 121, 399-409.
- Lazo et al., (1991). *Bio/Technology* 9, 963-967.
- Li et al., (1999a). *Plant physiology.* 120, 1147-1155.
- Li et al., (1999b). *Theoretical and Applied Genetics* 98, 1208-1216.
- Li et al., (2000). *Plant Physiology* 123, 613-624.
- Li et al., (2003). *Funct Integr Genomes* 3: 76-85.
- Lumdubwong et al., (2000). *J Cereal Sci* 31, 63-74.
- Maniatis et al., (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press New York.
- McCreery and Helentjaris (1994). Method in Molecular Biology, Vol. 28: Protocols for Nucleic Acid analysis by non-radioactive probes, 67-71, Humana Press Inc., Totawa, NJ.
- Mizuno et al., (1993). *Journal of Biological Chemistry* 268, 19084-19091.
- Mizuno et al., (1992). *Journal of Biochemistry* 112, 643-651.
- Mizuno et al., (2001). *Plant Cell Physiol* 42, 349-357.
- Morelletal., (1997). *Plant Physiology* 113, 201-208.
- Morell et al., (1998). *Electrophoresis* 19, 2603-2611.
- Morell et al., (2003). *Plant J.* 34: 173-185.
- Morrison and Laignelet (1983).. *Journal of Cereal Science* 1: 9-20.
- Mullins et al., (1999). *European Journal of Plant Pathology* 105: 465-475.
- Myers et al., (2000). *Plant Physiology* 122, 989-997.

- Nakamura (2002). *Plant Cell Physiology* 43, 718-725.
- Nakamura and Yamanouchi (1992). *Plant Physiol* 99: 1265-1266.
- Nair et al., (1997). *Plant Sci* 122: 153-163.
- Nishi et al., (2001). *Plant Physiology* 127, 459-472.
- Rahman et al., (1995). *Australian Journal of Plant Physiology* 22, 793-803.
- Rahman et al., (1997). *Genome* 40: 465-474.
- Rahman et al., (1999). *Theor Appl Genet.* 98: 156-163.
- Rahmanetal., (2000). *J Cereal Sci* 31 : 91-110.
- Rahman et al., (2001). *Plant Physiol* 125 : 1314-1324.
- Repellin et al., (1997). *Plant Gene Reg* 97-094
- Safford et al., (1998). *Carbohydrate Polymers* 35, 155-168.
- Schulmanand Kammiovirta, (1991). *Starch* 43, 387-389.
- Schwall et al., (2000). *Nature Biotechnology* 18, 551-554.
- Senior (1998). *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 15,79-119.
- Shannon and Garwood, (1984). In *Starch: Chemistry and Technology*, Whistler et al., eds, Academic Press, Orlando, FL, pp25-86.
- Shure et al., (1983). *Cell* 35, 225-233.
- Sidebottom et al., (1998). *Journal of Cereal Science* 27, 279-287.
- Smidansky et al., 2003) *Planta* 216, 656-664.
- Smith et al., (2000) *Nature* 407, 319-320.
- Sun et al., (1996). *Physiol Plantarum* 96, 474-483.
- Sun et al., (1997). *The New Phytologist* 137, 215-215.
- Sun et al., (1998). *Plant Physiol* 118, 37-49.
- Takeda et al., (1986). *Carbohydr Res* 148, 299-308.
- Takeda et al., (1987). *Carbohydr Res* 168, 79-88.
- Takeda et al., (1993a). *Carbohydrate Research* 240, 253-262.
- Takeda et al., (1993b). *Carbohydrate Research* 246, 273-281.

- Terada et al., (2000). *Plant Cell Physiol* 41, 881-888.
- Thomas and Atwell 1999 *Starches Eagen Press*, St Paul, Minnesota, USA pp: 13-24.
- Thorbjornsen et al., (1996). *Plant Journal* 10,243-250.
- Wang et al., (1990). *Nucl Acids Res* 18, 5898.
- Wang et al., (1998a). *Journal of Experimental Botany* 49, 481-502.
- Wang et al., (1998b). *Acta Hort* 461, 401-407.
- Wegener et al., 1994. *Mol. Gen Genet.* 245, 465-470.
- Yamamori et al., (2000). *Theor. Appl. Genet.* 101, 21-29
- Yamanouchi and Nakamura (1992). *Plant Cell Physiol* 33, 985-991.
- Young. (1984). in Whistler et al. (eds), Academic Press, Orlando, FL, chap 8.
- Zhang et al., (1997). *Mol Biotechnol* 8, 223-231.
- Zikiryaeva and Kasimov, (1972). *Uzbekskii Biologicheskii Zhurnal* 6,18-20.
- Zwar and Chandler, (1995). *Planta* 197, 39-48.

표면

도면1

```

1 GCCACCGACA TCCGCCGCAA TGCTGTGTCT CACCTCCTCT TCCTCCTCCG CGCCCGCTCC
61 GCTCCTTCCC TCTCTCGCTG ATCGACCGAG CCGGGGAATC GCGGGCGGGG GTGGCAATGT
121 TCSCCTGAGC GTGGTTTCTT CGCCGCGCGG GTCTGGCCTT GGAAAGGTCA AGACCAATTT
181 CTCAGTTCCT GCGACTGCGC GAAAAACAA AACCATGGTG ACTGTTGTGG AGGAGGTCGA
241 CCACCTTCCT ATATATGATC TCGACCTTAA GTGGAGGAA TTCAAGGATC ACTTCAACTA
301 TAGGATAAAA AGATACCTCG ACCAGAAATG CCTGTTGAA AACATGAGG GGGGCTTGA
361 AGAATTTTCT AAAGGCTATT TGAAGTTTGG GATTAAATCA GTTGATGGTG CCACAATATA
421 TCCTGAATGG CGGCTGCTG CACAAGAGC ACAGCTCATT GGTGAGTTCA ATAACCTGGA
481 TGGTGCAAAA CACAAGATGG AGAAGGATAA ATTTGGCATT TGGTCAATCA AGATTTCACTA
541 TGTCAATGGG AAGCCTGCCA TCCTTCACAA TTCCAAGGTT AAATTTCTGT TTAGGCATGG
601 GGGTGGAACA TGGGTFGATC GTATTCCCGC ATGGATTCTG TATGCAACTT TTGATGCTTC
661 TAAATTTGGA GCTCCATATG ATGGTGTACA CTGGGATCCT CCAGCTGTG AAAGGTACGT
721 GTTTAAGCAT CCTCGACCTC CAAACCTGA TGTCCACGCG ATCTATGAGG CTCATCTGGG
781 GATGAGTGGT GAAGAGCCAG AAGTAGCAC ATACAGAGAA TTTCAGACA ATGTGTTACC
841 ACGCTAAGG GCAATTAATC ACATCAGCT TCAATTAATG GCAATCATGG AACATTCCTA
901 CTATCTCTCT TTTGGCTATC ACTGACAAA TTTTTCGCA GTACGACGA GATCAGGAAC
961 ACCAGAGGAT CTGAATATC TTGTTGACAA GGCATATAGT TTAGATTAAC GAGTTCTGAT
1021 GGAATGTTTC CATAGCCATG CGAGTAATAA TGTACCCGAT GCTCTAATAG GCTATGACGT
1081 TGGACAAAAC ACTCATGAGT CTTATTTTCA TACAGGAGAT AGGGGCTACC ATAACTCTTG
1141 GGATAGTCTG CTGTTCAACT ATGCCAATTG GGAGGTCCTA AGATTTCTTC TTTCTAATTT
1201 GAGCATTTGG ATGGACGAAT TCATGTTTGA TGGCTTCOGA TTTGATGGGG TTACATCAAT
1261 GCTACATCCAT CACCATGGTA TCAATAAGGG ATTTACTGGA AACTACAAGG AGTATTTTCA
1321 TTTGGATACC GATGTGGATG CAATGTGTTA CATGATGCTC GCATAACCAT TAATGCATAA
1381 ACTCTTGGCG GAAGCAACTA TTGTTGTGTA AGATGTTTCC GGCAATGCCG TGTCTTGTGG
1441 GCGAGTTGAT GAAGGTGGAG TAGGTTTGA CTTCGCCCTG GCAATGGCCA TTCTGTATAG
1501 ATGATTTGAC TACCTGAAGA ACAGAGGGA CCGCAATGG TCAATGAGTG AAATAGTGCA
1561 AACTTTGACT AACAGAGAT ATACGAAAA ATGCAATTGC TATGCCGAGA GCCATGATCA
1621 GTCCATTTGT GGTGACAAGA CTATAGCAAT TCTCTTGATG GACAAGGAAA TGTACACTGG
1681 CATGTGAGAC TTGCAGCCTG CTTCACCTAC CTTCAACCTT GGCATTTGAC TCCAAAAGAT
1741 GATTCACATC ATTACGATGG CCGTTGAGG TGATGGCTAC TTAATTTTGA TGGGCAATGA
1801 GTTTGCCCCA CAGAAATGGA TTGACTTTCC AAGAGAAGGC AACCACTGGA GCTATGATTA
1861 ATGCAGACGT CAGTGGAGCC TTGTCGACAC TGATCACCCT CGATACAAGT ATATGAATGC
1921 ATTTGATCAA GCAATGAATG CACTCGAGGA GGAAATTTCC TTCTGTTCAT CATCAAAGCA
1981 GATTTGTTAG GACATGAACG AGAAGATTA GGTATTTGTC TTTGAACGTG GAGATTTGTT
2041 TTTGTTTTC AATTTTCATC CCAACAAAAC TTACAAGGGT TACAAGCTCG GATGTGACTT
2101 CCGCGGGAAG TACAGATAG CTCTGGAATC TGATGCTTTG GTCTTTGGTG GCCATGGAAG
2161 AGTTGCCCCA GATCTGATC ACTTCAGCTC TCCTGAGGGA ATGCCAGGAG TACCAGAAAC
2221 AAATTTCAAC AACCCCTTA ACTCATCTCA AGTCCTTTCC CCGCCCGTA CCGTGTGGC
2281 TTACTATCGC GTTGATGAAG ATCTGTGAAG GCTCAGGAGG GTGTGAGCAG TTGTTCTTGG
2341 AAGATTTGTT ACAGAGTATA TCGATGTTGA AGCAACAAGT GGGGAGACTA TCTCTGTGGG
2401 CTGGAAGGCG TCCGAGAAAG ACGATTGTGG CAAGAAAGGG ATGAAGTTTG TGTTCGCTC
2461 TTCTGACGAA GACTGCCAAT GAAGCATCAG ATTTCTTGAT CAGGAGCAAC TGTGTGTGCC
2521 CTGTTAATCT GGAGATCCTG GCTTGCTTTG GACTTGGTTG TGGTTCTTTA GCAGTTGCTA
2581 TGTACCTATC TATGATATGA ACTTTATGTA TAGTTCCGCT TAAAGAAAGA ATAAGCAGTG
2641 ATGATGTGGC CTTAAACCTG AGCTGCACAA GCCTAATGTA AAATTAAGT TTACGCTTTT
2701 CATCCAGGAT AAAACAGCTG TTCATTTACC ATCTCAAAA

```

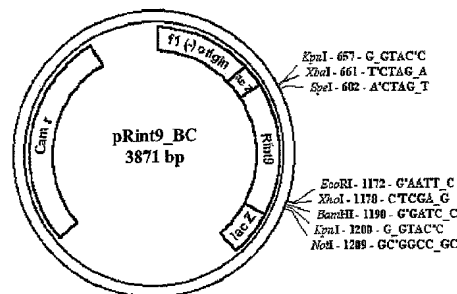
도면2

1 CTTGACTCCC CCCACTCCTC CCTCGTCTG CTCCCTCTCG TCGCTCGGCT CGAGGCGCGG  
 61 CATTTGCGGC GGGAGGGATC TGCGCGCGAG TCGCTGCGGG CAGGCGGCGG GGGAGCACGC  
 121 ACCGGGGGAT GCGCTCGTTC GCGCTGTCGG GCGCGAGGCT CGGGGTCTGT CGGGCGGGGG  
 181 GCGGCGGCGG CCGCGGGGGT GCGCGGCGGG CCGGATCCGG CCGGGTGGAC TTGCGCTCGG  
 241 TGCTCTTCAG GAGGAAGGAC TCCTTCTCAC GTGGCTTTGT GAGCTCGCGG GGTGCTCTGT  
 301 GGAGGGTCTT GGTGCTGTGC GTGGGAGCG ACAGCTTGCT GTCTCTGTGG GAACCGAGCG  
 361 TGGAACTTCA AGAGCAACCT GAAGAATCTC AGATACCTGA TGATAATAAA GTAAACCTTT  
 421 TTGAGGAGGA GGAAGAGATT CCAGCACTGG CAGAAGCAAG CATAAAGGTT GTGGCTGAAG  
 481 ACAAACCTTGA ATCTTCAGAA GTGATTCGAG ACATTTAGGA AATGTGACT GAGGGTGTGA  
 541 TCAAAAGATGC TGATGAACCA ACTGTGGAGG ATAAACCAAG AGTTATCCCA CCACCAGGAG  
 601 ATGGGCAGAA GATATACCAA ATTGACCCAA TGCTGGAAGG ATTTGGAAC CATCTTGACT  
 661 ACCGATACAG TGAATACAAG AGAATGCGTG CAGCTATTGA CCAACATGAA GGTGGCTTGG  
 721 ATGCATTTTC TCGTGGTTAC GAAAAGCTTG GATTCACCCG CAGCGTGA GGCATACCTT  
 781 ACCGAGAAAT GGCACCTGGA GCACAGCTCT CAGCATTAAT AGGTGACTTC AACAAATCGA  
 841 ACCCAATATG AGATACTATG ACCAGAAATG AGTATGGTGT TTGGGAGATT TCCCTGCCTA  
 901 ACAATGCTGA TGGATCCCTT GCTATCTCTC ATGGCTCAGG TGTAAAGATT CGGATGGATA  
 961 CACCATCTGG CGTAAAGGAT TCAATTCCTG CCGGATTAAT GTTTGCTGTG CAGGCTCCAG  
 1021 TGGAAATACC GTACAAAGGT ATATATTAAT ATCCACCTGA AGAAGAAAAA TATGTATATC  
 1081 AATCATCTCA ACCTAAACGA CCAAAATCGC TGCGGATATA TGAATCACAT ATTGGAATGA  
 1141 GTAGCCCGGA ACCGAAGATA AACACATATG CTAAATTTAG GGAATGAGGT CTACCAAGAA  
 1201 TTAAAAAGCT TGGTACAAT CCGTACAGTA TAATGGCAAT CCAGGAGCAC TCTTATTAAG  
 1261 CAAGCTTTGG GTATCATGTT ACTAACTCTT TTGCGCCAAAG TAGCCGTTTC GGAACCCACG  
 1321 AAGACTTTGA ATCTCTGATT GATAAAGCTC ACGAGCTTGG TTTGCTTTGA CTTATGGATA  
 1381 TTGTTTACAG TCATGCATCA AACAAATCCC TGGATGGTTP GAATGTTTTT GATGGTACTG  
 1441 ATACACATTA CTTCATGCTT GGAACACGGG GTCTACATCT GATGTGGGAT TCTCGCTGTG  
 1501 TCAACTATGG GAGTTGGGAA GTTCTAAGAT ATTTACTCTC GAATGCAAGG TGGTGGCTTG  
 1561 AAGAATACAA GTTTGATGGG TTTGATTTTG ATGGGGTGAC CTCCATGATG TATACTCATC  
 1621 ATGGTTTACA GGTGGCATTT ACTGGCAACT ATGGCGAATA TTTTGGATTT GCTACTGATG  
 1681 TTGATGCACT AGTTTACTTG ATGCTCTGTA ACGATCTAAT TCGTATTTCT GTTCAAGATG  
 1741 CTGTAGCCAT TGTGAAGAT GTACGCGGGA TGCCACATTT TTGTATTTCT GTTCAAGATG  
 1801 GTGGTGTGG TTTTGAATAT CGTTTGCATA TGGCTGTACC GGAACAATGG ATCGAATCTC  
 1861 TCAAGCAAGG TGACGAATAT TGGAAAATGG GTGATACCGT GCACACCTTA ACGAATAGAA  
 1921 GGTGTCTAGA GAATGTGTGT ACTTATGCGA AAGATCATGA CCAAGCACTA GTTGTGACA  
 1981 AGACTATTCG ATCTCTGTTG ATGGATTAAG ATATGTATGA TTTTATGGCT CTAGACAGAC  
 2041 CTTCAACACC TCGCATTTGAT CCGGGATAG CATTCATATA AATGATTAGG CTGTCTACCA  
 2101 TGGGCTTAGG AGCGAAGGC TATCTTAATT TCATGGGAAA TGAATTTGGG CACCTGAAAT  
 2161 GGAATAGATT CCAAGAGGC CCGCAAGTTC TTCCAAATGG CTCGGTCTCT CCAGGAACAA  
 2221 ACTACAGTTT TGATAAATGC CGTCTAGAT TTGACCTTGG AGATGCAAT TATCTTATGAT  
 2281 ATCATGGTAT GCAAGAGTTT GATCAGGCA TGACAGCATCT TGACGAAGAA TATGGAATCA  
 2341 TGACATCTGA GCACCATAT ATATCGCGCA AACACGAGGA GGAATAAGGT ATCATCTTTCG  
 2401 AGAGAGGAGA TTTGTATTTT GTGTTCAACT TCCACTGGAG TAATAGCTAT TTTGACTATC  
 2461 GCGTGGGTTG TTTAAGGCTT GGAAGTACA AGATTTGTGT GGAATCAGAC GATGGCTCTC  
 2521 TTGTTGGATT CAGTCCGCTT GATCATGATG CTGATGACTT CACTGCTGAC TGCGCGCATG  
 2581 ACAAAGAGCC ATGTTCATTC TCGGTGTACA CCCCAGCAG AACCGCGTC GTGTATGCAC  
 2641 TTACAGAGGA CTAAATCATC GCTGTGATCA TTGGGGGAACT AACTCAAGGG AGTTGTGGT  
 2701 AATGACGCGG GATACAACT CAGTGAAAG GTGAAAGAA AGCGTGCCCT GACGATGTGA  
 2761 TTGAGGGGCG TTGTGTTTCA TCGCCAAATCC CAGGAAGATG AGGTAGAAA GCTTACTGAT  
 2821 GAGCTCTCTT TTTCGAGTGA CTCGTGAAGG AATAGAACCA GGGTGAACGG CTTTTCCTAG  
 2881 AGCTATACCA AACCATCTCT ATGTTGCGCA TTGCTGTAG TTTTGTACAT AACGATATCG  
 2941 GTTGGCATTT GTATGTTTAT GAATAATCTG TTGACAGAA ATGTTTCTCT CCTTGTATTT  
 3001 AGTGTCTCAA AAAAA

도면3

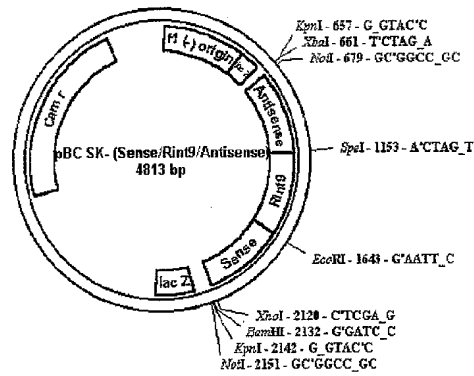
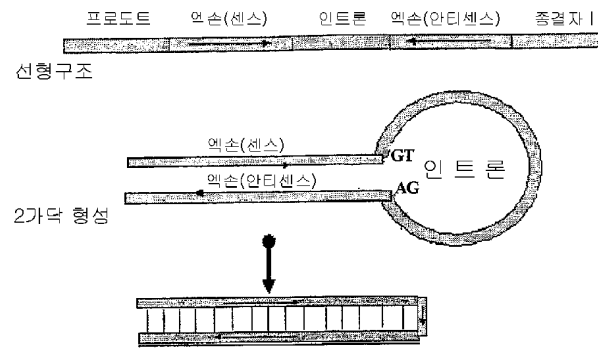
1 CGGGCCACAC CCACACACCG ACCACCAGGC AGCGCCCTCT CGCTTTGGCT CTGCGGTGAG  
61 GAGGCTTTAG GTGGAAGCAG AGCGCGGGGG TTGCGGGGGG ATCCGATCGG GCTGCGGTGC  
121 GGGCGGAGATG GCGGCGCGCG CGCTGCGGTG TCCCGGGAGC GCGGCGGGGG TACGGGCGGG  
181 GGGCTGCGGG TTCTCGGTGC CAGCGCGGGG CCGGAGCTGG CGTGGCGGGG CGGAGCTCCC  
241 GAGCTGCGGG TCGCTGCTCT CCGCGCGGGG ATTCCCCGCT GCGCTTCGGG TGGGGGGTTC  
301 CCGGGGGGGG GTGGCGGTGC GCGGGGGGGG CGCTCAGGG GAGGTGATGA TCCCGGAGGG  
361 CGAGAGCGAC GGGATGCGGG TTTCAGCAGG TTCAGACGAT CTGCGGTGCG CAGCCTTAGA  
421 TGATGAATTA AGCAGCGAGG TTGGAGCTGA AGTTGAGATG GAGTCATCTG GAGCAAGTGA  
481 CTTTGAAGGC GTGAAGAGAG TGGTTGAGA ATTAGCTGCT GAGCAGAAC CACGAGTTGT  
541 CCCACCAACA GGAGATGGGC AAAAATATAT CCAGATGGAC TCTATGCTTA ATGGCTATAA  
601 GTACCATCTT GAATATCGAT ATAGCTATA TAGGAGACTG CGTTCAGACA TTGATCAGTA  
661 TGAAGGAGGA CTGGAACAT TTCTCGCGGG TTATGAGAAG TTGGATTTA ACCACAGTGC  
721 TGAAGGTGTC ACTTATCGAG AATGGGCTCC CGGGGCGACAT TCTGCGCAT TAGTAGTGA  
781 CTTCAACAAT TGGAAATCCAA ATCGAGACCG CATGAGCAAA AATGAGTTTG GTGTTTGGGA  
841 GATTTTCTTG CCTAACATG CTGATGGCTC ATCTCTTATC CCACATGGCT CACGTGTAA  
901 GGTGCAATG GAAGCTCCAT CTGGTATAAA GGAATCTATC CCGCTCGGA TCAAGTACTC  
961 TTGCGAGGCC GCAAGAGAAA TCCCATACAA TGGAAATATC TATGATCTTC CTGAAGGGA  
1021 GAAGTACATA TTCAACGATC CTCAACCTAA AAGACCAAG TCATTCGCGA TATACGAAC  
1081 TCATGTTTGA ATGATAGCA CGGAGCCAAA GATCAACAG TATGCAACT TTAGGGATGA  
1141 GGTGCTTCCA AGAATCAAAA AGCTTGGATA CAATGCAATG CAATATATG CAATATATG  
1201 GCATGCTAT TATGGAAGCT TTGGGTACCA TGTCAACAA TTCTTTGAC CAAATATATG  
1261 TTTCGGGACC CCAAGAGATT TAAAGTCATT GATTCATAAA GCTCATGAGC TTGGTTTAGT  
1321 TGTGCTCATG GATGTTGTTT ACAGCCATGC GTCAATATA ACCCTAGATG GGTGGAACGG  
1381 TTTTGATGCT ACAGATACCG ATTACTTTCA TAGTGTTC TAAGGCGCAT ATGGATGTG  
1441 GATTTCTGCG CTTTTCACAT ATGGGAATGG GGAAGTTCTA AGATTTCTAC TATCCAATGC  
1501 AAGATGGTGG CTCGAGGAGT ATAAGTTTGA TGGTTTCAGA TTGACGGTG TAACTCAAT  
1561 GATGTACACT CATCATGGAT TACAAGTAGC ATTTACGGGG AACTACAGTG AATACTTTG  
1621 ATTTGCCACT GATGCTGATG CAGTAGTTTA CTTGATGCTG GTAAATGATT TAATTCATGG  
1681 ACTTTATCTT GAGGCCATGA CCATCGGTGA AGATGTCAGT GGAATGCTTA CATTTGCCCT  
1741 TCCTGTTCAA GATGGTGGGG TTGGTTTGA TTAATCGCCT CATATGGCTG TTCTTGACAA  
1801 ATGGATTGAA CTCTTCAAGC AAGGTGATGA ATCTTGGAG ATGGGTGATA TTGTTGACAC  
1861 ACTGACTAAC AGAAGCTGGT CAGAGAGATG TGTACTTAT GTCGAAAGTC ATGATCAAGC  
1921 ACTAGTTGGT GACAAACTA TTGCATCTCG GTTCATGAGC AAGGATATGT ATGATTTTAT  
1981 GGTCTCTGAC AGACCGGCAA CACCTAGCAT TGATCGTGGG ATAGCATTCG ATAAATGAT  
2041 TAGACTTATC ACAATGGGCT TAGGAGGAGA AGGCTATCTT AACTTTATGG GAAATGAGTT  
2101 CGGACATCTT GAATGGATTC ATTTTCCAG AGCTCCACAA GTACTTCCAA ATGGTAAAT  
2161 CATCCAGGGG AATAACAACA GTTATGATA ATGCCCTCGA AGATTTGACC TGGGTGATGC  
2221 GGAATATCTT AGGTATCGTG GCATGCTAGA GTTTGACCG GCGATGCACT CTCTCGAGGA  
2281 AAAATATGGG TTCTATGACAT CAGACCAACA GTACATATCT CGAAAGCATG AAGAGGATAA  
2341 GATGATTTATA TTGAGAGAGG GAGATCTGCT ATTTGTGTTT AACTTCCATC GGAGTACACG  
2401 CTATTTTGAC TACCCTGTTG GTTGTTTAAA GCGAGGGAAA TACAAGGTGG TCTTGGACTC  
2461 AGATGCTGGA CTCTTTGGTG GATTTGGCAG GATCCATCAC ACTGCAAGAG ACTTCACTGC  
2521 CGATTTGTCA CATGACAACA GGCCCTACTC GTTCTCAGTT TACTCTCCTA GCAAGACCTG  
2581 GGTGTTCTAT GCTCCAGCGG AATGAGAAC CCAAGAGGCA GCATGCAAGT GTGTGCGGCT  
2641 CTTAGTCCGA AGGAGCAAGA AAAACTAGTT GCGAGCAATC TGTGAACGGC TTCTCTAGCT  
2701 TCTGCTTCGA TGAATGCGG ATAGCTAGA CAGCTTGCTT TGTGCTTTG CACTCCCAAT  
2761 TTGTAGTTTT AGTTTGTGAG GGAAGGAAC GTTATTTGCT ACTTATCTAT GGTGTCGAA  
2821 CGGCGACGAA ACCATGAACC CGGTATATTT GTTGGTACCG TTGCAACTGC CAGTTATAGA  
2881 TAGTCTGCA CTCTGTACA TCTGTGATG CTGGAATC

도면4

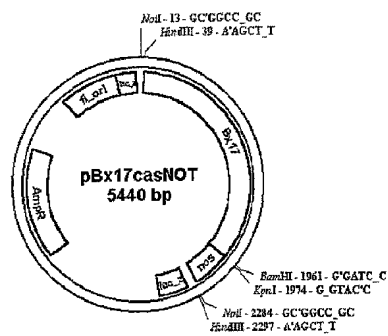




도면5



도면6



도면7a

```

82 GCGCGGGGTTGCGCGGGGATCCGATCCGGCTGCG.GTGCGGGCGAGATG 130
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
55 ggcgggcatattggcgggga.ggggactgcgogcgagtgcggtcgggcag 103
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
131 GCGGC.....GCGGCGTCTGCGGTTCCCGGA 153
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
104 gcgcggggggagcacgcacgggggatggcggtcttcgcggtgtcc.ggc 152
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
155 GCGCGGGGGGCTACGGCGGGGGCGGTGCGGTTCCCGTGCCAGCCGG 208
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
153 gcgaggctcggggtcggtcgggcgggggcgg....cggcggcggggg 198
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
209 GCGCGGAGCTGGCGTGCGGGCGCGAGCTCCCGACGTCCCGTCCGCTGCT 258
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
199 gtggccggcgggcgatccggcgggg....tggacttgccgtcggtgct 244
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
259 CTCGGGCGGAGATTCCCGGTGCCGTTCGCTGGGGGTTCCGGGGGC 308
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
245 cttcaggagga.....aggactccttctcacgtggcgtt..... 278
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
309 GCGTGGCGGTGCGCGCGCGGCGCGCTCAGGGGAGGTGATGATCCCGAG 358
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
279 .....gtgagctgcgcggtgctcctctgggaaggtgctggtgccggc 320
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
359 GCGGAGGCGACGCGGATGCCGTTTCAGCAGGTTGAGACG..... 398
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
321 ggtgggagcgacacttgctgtctctgcggaaccagacgtggaactca 370
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
399 .....ATCTGCAGTTGCC.....AGCCT 416
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
371 agagcaacctgaagaatcc.cagatacctgatgataataaagtaaacct 419
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
417 T.....AGATGATGAATTAAGCACGGAGGT 441
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
420 tttagggaggaggaagagattccagcagtggcagaagcaagcataaaggt 469
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
442 TGGAGCTGAAGTTGAGATTGAGTCATC.....TGGAG 473
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
473 tgtggctgaagacaaacttgatcttcagaagtgattcaagacattgagg 519
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
474 CAAGTGACGTTGAAGGCGTGAAGAGAGTGGTTGAAGAATTAGCTGCTGAG 523
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
520 aaaatgtgactgggggtgtgatcaaagatgctgatgaaccaactgtggag 569
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
524 CAGAAACCGAGTTGTCCCAACCAACAGGAGATGGGCAAAAAATATTCCA 573
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
570 gataaacacaggttatcccaaccaggagatgggcagaagatatacca 619
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
574 GATGGACTCTATGCTTAATGGCTATAAGTACCATCTTGAATATCGATATA 623
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
620 aattgaccaatgctggaaggatttoggaaacctcttgactaccgataca 669
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
624 GCCTATATAGGAGACTGCGTTCAACATTGATCAGTATGAAGGAGGACTG 673
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
670 gtgaatacaagagaatgcgtgcagctattgaccaacatgaaggaggcttg 719
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

```

도면7b

```

674 GAAACATTTTCTCGCGGTTATGAGAAGTTTGGATTTAATCACAGTGTGA 723
   || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
720 gatgcattttctcgtggttacgaaaagcttggattcaccgcgagcgctga 769
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
724 AGGTGTCACTTATCGAGAATGGGCTCCCGGGGCACATTCTGCAGCATTAG 773
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
770 aggcattacctaccgagaatgggcacctggagcacagtctgcagcattag 819
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
774 TAGGTGACTTCAACAATTGGAATCCAAATCCAGACCGCATGAGCAAAAAT 823
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
820 taggtgacttcaacaattggaacccaatgcagctactatgaccagaaat 869
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
824 GAGTTTGGTGTGTTGGGAGATTTTCTGCCTAACAAATGCTGATGGGTCAATC 873
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
870 gagtatgggttttgggagatttccctgcctaacaatgctgatggatcccc 919
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
874 TCCTATTCCACATGGCTCACGTGFAAAGGTGCGAATGGAACCTCCATCTG 923
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
920 tgcatttccctcattggctcaggtgtaagattcggatggatacaccatctg 969
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
924 GTATAAAGGATTCTATTCTGCTGGATCAAGTACTCTGTGAGGCCGCCA 973
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
970 gcgtaaaggattcaattcctgcctggattaagtttgcgtgacaggctcca 1019
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
974 GGAGAAATCCCATACAATGGAATATATTATGATCCTCTGAGAGAGAGAA 1023
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1020 ggtgaataccgtacacgggtatatattatgatccacctgaagaagaaaa 1069
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1024 GTACATATCAAGCATCCTCAACCTAAAAGACCAAGTCAATGCGGATAT 1073
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1070 atatgtattccaacatccccaacctaaacgaccaaattcgtcgggat 1119
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1074 ACGAAACTCATGTTGGAATGAGTAGCAGCGAGCCAAAGATCAACACGTAT 1123
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1120 atgaatcacatattggaatgagtagcccggaaccgaagataaacacatat 1169
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1124 GCAAACTTTAGGCATGAGTGCCTTCCAAGAATCAAAAAGCTTGSATACAA 1173
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1170 gctaatttttagggatgaggtgctaccaagaactaaaaagcttgggtacaa 1219
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1174 TGCAGTGCAAAATAATGGCAATTCAGAGCATGCATATTATGGAAGCTTTG 1223
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1220 tgctgtacagataatggcaatccaggagcactcttattacgcaagctttg 1269
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1224 GGTACCATGTCACCAATTTCTTTGCAACCAAGTAGTCGTTTGGGGACCCCA 1273
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1270 ggtatcatggttactaactcttttggccaagtagccgtttcggaaaccca 1319
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1274 GAAGATTTAAAGTCATTGATTGATAAAGCTCATGAGCTTGGTTTAGTTGT 1323
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1320 gaagacttgaaatctctgattgataaagctcacgagcttggtttgettgt 1369
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1324 GCTCATGGATGTTGTTTCAACGCCATGCGTCAAAATAATACCTAGATGGGT 1373
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1370 acttatggatattgttcacagctcatgcatcaaacataacccggatgggt 1419

```

- 44 -

598

1	CTCAGCTCTN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
36	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
111	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
166	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
221	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
276	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
331	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
386	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
441	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
496	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
551	CTTGTAACCT	AGTGATTC					

서열목록

<110> Commonwealth Scientific and industrial Research Organisation

<120> Rice and Rice Products thereof having Starch with an Increased Proportion of Amylose

<150> US60/515102

<151> 2003-10-27

<160> 3

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 2739

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<223> sbe | cDNA

<400> 1

gccaccgaca tccgccgcaa tgctgtgtct cacctcctct tcctcctccg cgcccgctcc 60

gtccttccc tctctcgtg atcgaccgag cccgggaatc gcggcgggg gtggcaatgt 120

tcgcctgagc gtggtttctt cgccgcgcgc gtcgtggcct ggaaagggtca agaccaattt 180

ctcagttcct ggcactgcgc gaaaaaaca aacctgggtg actgttgtgg aggagggtcga 240

ccaccttct atatatgatc tggaccctaa gttggaggaa ttcaaggatc acttcaacta 300

taggataaaa agatacctcg accagaaatg cctgattgaa aaacatgagg ggggccttga 360

agaattttct aaaggctatt tgaagtttg gattaatata gttgatgggt ccacaatata 420

tcgtgaatgg gcgcctgctg cacaagaagc acagctcatt ggtgagttca ataactggaa 480

tggtgcaaaa cacaagatgg agaaggataa atttggcatt tggatcaatca agatttcaca 540

tgtcaatggg aagcctgcc tccctcaca ttccaagggt aaatttcgct ttaggcattg 600

gggtggagca tgggttgatc gtattccgc atggattcgt tatgcaactt ttgatgcctc 660

taaatttga gctccatatg atggtgtaca ctgggacct ccagcctgtg aaagggtacgt 720

gtttaagcat cctcgacct caaaacctga tgctccacgc atctatgagg ctcatgtggg 780

gatgagtgg gaagagccag aagtaagcac atacagagaa tttgcagaca atgtgttacc 840

acgcatacgg gcaaataact acaacacagt tcagttaatg gcaatcatgg aacattccta 900

ctatgcttct tttgggtatc acgtgacaaa ttttttcgca gtcagcagca gatcaggaac	960
accagaggat ctgaaatata ttgttgacaa ggcacatagt ttaggattac gagttctgat	1020
ggatgttgtc catagccatg cgagtaataa tgtgaccgat ggtctaaatg gctatgacgt	1080
tggacaaaac actcatgagt cttattttca tacaggagat aggggctacc ataaactctg	1140
ggatagtcgt ctgttcaact atgccaattg ggaggcttta agatttcttc tttctaattt	1200
gagatattgg atggacgaat tcatgtttga tggcttccga tttgatgggg ttacatcaat	1260
gctataccat caccatggta tcaataaggg atttactgga aactacaagg agtatttcag	1320
tttgataacc gatgtggatg caattgttta catgatgctc gcaaaccatt taatgcataa	1380
actcttgccg gaagcaacta ttgttgctga agatgtttcg ggcatgccag tgctttgtcg	1440
gccagttgat gaaggtggag tagggtttga cttccgcctg gcaatggcca ttcctgatag	1500
atggattgac tacctgaaga acaaagagga ccgcaaatgg tcaatgagtg aaatagtgca	1560
aactttgact aacaggagat atacagaaaa atgcattgcc tatgccgaga gccatgatca	1620
gtccattgtt ggtgacaaga ctatagcatt tctcttgatg gacaaggaaa tgtacactgg	1680
catgtcagac ttgcagcctg cttcacctac catcaaccgt ggcatcgac tccaaaagat	1740
gattcacttc attacgatgg cccttgaggg tgatggctac ttaaatttta tgggcaatga	1800
gtttggccat ccagaatgga ttgactttcc aagagaaggc aacaactgga gctatgataa	1860
atgcagacgt cagtggagcc ttgtcgacac tgatcacctt cgatacaagt atatgaatgc	1920
atttgatcaa gcaatgaatg cactcgagga ggaattttcc ttctgtcat catcaaagca	1980
gattgttagc gacatgaacg agaaagataa ggttattgtc tttgaacgtg gagatttggt	2040
ttttgttttc aattttcatc ccaacaaaac ttacaagggg taaaaagtcg gatgtgactt	2100
gcccgggaag tacagagtag ctctggactc tgatgctttg gtctttggtg gccatggaag	2160
agttggccat gatgtggatc acttcacgtc tcccaggga atgccaggag taccagaaac	2220
aaatttcaac aaccgcccta actcattcaa agtcctttcc ccgcccgtta cctgtgtggc	2280
ttactatcgc gttgatgaag atcgtgaaga gctcaggagg ggtggagcag ttgcttctgg	2340
aaagattgtt acagagtata tcgatgttga agcaacaagt ggggagacta tctctggtgg	2400
ctggaagggc tccgagaagg acgattgtgg caagaaaggg atgaagtttg tgtttcggtc	2460

ttctgacgaa gactgcaaat gaagcatcag atttcttgat caggagcaac tgttggtgcc	2520
cttgtaatct ggagatcctg gcttgcttg gacttggttg tggttcttta gcagttgcta	2580
tgtacctatc tatgatatga actttatgta tagttcgct taaagaaaga ataagcagt	2640
atgatgtggc cttaaacctg agctgcacaa gcctaataaagt ttcaggcttt	2700
catccagaat aaaacagctg ttcatttacc atctcaaaa	2739

<210> 2  
 <211> 3015  
 <212> DNA  
 <213> Oryza sativa  
 <223> sbeIIa cDNA

<400> 2	
cttgactccc cccactcctc cctcgtgctg ctctctctcg tcgctcggct cgaggcgcg	60
catttgccgc gggagggatc tgcgcgcgag tgcgtgcggg caggcggcgg gggagcacgc	120
accgggggat ggcgtcgttc gcggtgtccg gcgcgaggct cggggtcgtg cggcggggg	180
gcggcggcgg cggcgggggt ggcccggcg cgcgatccgg cggggtggac ttgccgtcgg	240
tgctcttcag gaggaaggac tccttctcac gtggcggtgt gagctgcgcg ggtgctcctg	300
ggaaggtgct ggtgcctggc ggtgggagcg acgacttgct gtcctctgcg gaaccagacg	360
tggaaactca agagcaacct gaagaatctc agatacctga tgataataaa gtaaaacctt	420
ttgaggagga ggaagagatt ccagcagtg cagaagcaag cataaagggt gtggctgaag	480
acaaacttga atcttcagaa gtgattcaag acattgagga aaatgtgact gaggggtgta	540
tcaaagatgc tgatgaacca actgtggagg ataaaccacg agttatcca ccaccaggag	600
atgggcagaa gatataccaa attgacccaa tgctggaagg atttcggaac catcttgact	660
accgatacag tgaatacaag agaatgcgtg cagctattga ccaacatgaa ggtggcttg	720
atgcattttc tcgtggttac gaaaagcttg gattcacccg cagcgtgaa ggcattacct	780
accgagaatg ggcacctgga gcacagtctg cagcattagt aggtgacttc aacaattgga	840
acccaaatgc agatactatg accagaaatg agtatggtgt ttgggagatt tccctgccta	900
acaatgctga tggatcccct gctattcctc atggctcacg tgtaaagatt cggatggata	960



caccatctgg cgtaaaggat tcaattcctg cctggattaa gtttgetgtg caggctccag	1020
gtgaaatacc gtacaacggt atatattatg atccacctga agaagaaaaa tatgtattcc	1080
aacatcctca acctaaacga ccaaattcgc tgcggatata tgaatcacat attggaatga	1140
gtagcccgga accgaagata aacacatatg ctaatttttag ggatgaggtg ctaccaagaa	1200
ttaaaaagct tgggtacaat gctgtacaga taatggcaat ccaggagcac tcttattacg	1260
caagctttgg gtatcatgtt actaacttct ttgcgccaag tagccgtttc ggaaccccag	1320
aagacttgaa atctctgatt gataaagctc acgagcttgg tttgcttgta cttatggata	1380
ttgttcacag tcatgcatca aacaataccc tggatggttt gaatggtttt gatgggtactg	1440
atacacatta cttccatggt ggaccacggg gtcatcactg gatgtgggat tctcgctgt	1500
tcaactatgg gagttgggaa gttttaagat atttactgtc gaatgcaagg tgggtggcttg	1560
aagaatacaa gtttgatggg tttcgatttg atggggtgac ctccatgatg tatactcatc	1620
atggtttaca ggtggcattt actggcaact atggcgaata ttttgattt gctactgatg	1680
ttgatgcagt agtttacttg atgctggtga acgatcta at tcatgggctt tatcctgagg	1740
ctgtagccat tggatgaagat gtcagcggga tgcccacatt ttgtattcct gttcaagatg	1800
gtggtgttgg ttttgactat cgtttgcata tggctgtacc ggacaaatgg atcgaactcc	1860
tcaagcaaag tgacgaatat tggaaaatgg gtgatatcgt gcacacccta acgaatagaa	1920
ggtggtcaga gaagtgtgtt acttatgcag aaagtcatga ccaagcacta gttggtgaca	1980
agactattgc attctggttg atggataagg atatgtatga ttttatggct ctagacagac	2040
cttcaacacc tcgcattgat cgtgggatag cattacataa aatgattagg cttgtcacca	2100
tgggcttagg aggcgaaggc tatcttaatt tcatgggaaa tgagtttggg catcctgaat	2160
ggatagattt cccaagaggc ccgcaaagtc ttccaaatgg ctcggtcctc ccaggaaaca	2220
actacagttt tgataaatgc cgtcgtagat ttgaccttg agatgcagat tatcttagat	2280
atcatggtat gcaagagttt gatcaggcca tgcagcatct tgaggaaaaa tatggattca	2340
tgacatctga gcaccagtat atatcgcgca aacacgagga ggataaggtg atcatcttcg	2400
agagaggaga tttggtattc gtgttcaact tccactggag taatagctat tttgactatc	2460
gcgtcggttg tttaaagcct ggaaagtaca agattgtgtt ggactcagac gatggcctct	2520

ttggtggatt cagtcggctt gatcatgatg ctgagtactt cactgctgac tggccgcatg	2580
acaacagacc atgttcattc tcggtgtaca ccccaagcag aaccgcgctc gtgtatgcac	2640
ttacagagga ctaatgatca gctctgatca ttgggggaac aactcaaggg agttggtggt	2700
aatgacgccg gaatacaact caagtgaaag gtgaaaagaa aggctgccct gacgatgtga	2760
tttgaggggc ttgtgtttca tcgccaatgc caggaagatg aggtagaaaa gcctactgat	2820
gagctcctgt tttcgagtga ctctgaagg aaatagacca gggtagaacg cttttttcag	2880
agctatacca aaccatcct atgttcgca ttcgctgtag ttttgtacat aacgatatcg	2940
gttggcattt gtatgtttat gaataatctg ttcgacagaa atgtttttct ctttgtattt	3000
agtgtctaaa aaaaa	3015

<210> 3  
 <211> 2918  
 <212> DNA  
 <213> Oryza sativa  
  
 <223> sbe IIb cDNA

<400> 3	
cggcgcacac ccacacaccg accaccaggc agcgcctect cgctttggct ctgcgctgag	60
gagggtttag gtggaagcag agcgcggggg ttgccggggg atccgatccg gctgcggtgc	120
gggcgagatg ggcgcgccgg cgtctgcggt tcccgggagc gcggcggggc tacgggcggg	180
ggcgtgcgg ttccccgtgc cagccggggc ccggagctgg cgtgcggcgg cggagctccc	240
gacgtcgcgg tcgctgctct ccggccggag attccccggt gccgttcgcg tggggggttc	300
cggggggcgc gtggccgtgc gcgcggcggg cgcgtcaggg gagtgatga tccccgaggg	360
cgagagcgac gggatgccgg tttcagcagg ttcagacgat ctgcagttgc cagccttaga	420
tgatgaatta agcacggagg ttggagctga agttgagatt gagtcactg gagcaagtga	480
cgttgaaggc gtgaagagag tggttgaaga attagctgct gagcagaaac cagcagttgt	540
cccaccaaca ggagatgggc aaaaaatatt ccagatggac tctatgctta atggctataa	600
gtaccatctt gaatatcgat atagcctata taggagactg cgttcagaca ttgatcagta	660
tgaaggagga ctggaacat tttctcgcgg ttatgagaag tttggattta atcacagtgc	720

tgaaggtgtc acttatcgag aatgggctcc cggggcacat tctgcagcat tagtaggtga	780
cttcaacaat tggaatccaa atgcagaccg catgagcaaa aatgagtttg gtgtttggga	840
gatttttctg cctaacaatg ctgatggctc atctcctatt ccacatggct cacgtgtaaa	900
ggtgcgaatg gaaactccat ctggtataaa ggattctatt cctgcctgga tcaagtactc	960
tgtgcaggcc gcaggagaaa tcccatacaa tggaatatat tatgatcctc ctgaagagga	1020
gaagtacata ttcaagcatc ctcaacctaa aagaccaaag tcattgcgga tatacgaaac	1080
tcatgttggga atgagtagca cggagccaaa gatcaacacg tatgcaaact ttagggatga	1140
ggtgcttcca agaatcaaaa agcttggata caatgcagtg caaataatgg caattcaaga	1200
gcatgcatat tatggaagct ttgggtacca tgtcaccaat ttctttgcac caagtagtcg	1260
tttcgggacc ccagaagatt taaagtcatt gattgataaa gctcatgagc ttgggttagt	1320
tgtgctcatg gatgttgttc acagccatgc gtcaaataat accctagatg ggttgaacgg	1380
ttttgatggg acagatacgc attactttca tagtggttca cgcggccatc attggatgtg	1440
ggatttctgc cttttcaact atgggaattg ggaagttcta agatttctac tatccaatgc	1500
aagatggtgg ctcgaggagt ataagtttga tggtttcaga tttgacggtg taacctcaat	1560
gatgtacact catcatggat tacaagtagc atttacgggg aactacagtg aatacttttg	1620
atttgccact gatgctgatg cagtagttta cttgatgctg gtaaatgatt taattcatgg	1680
actttatcct gaggccataa ccatcgggtga agatgtcagt ggaatgccta catttgccct	1740
tcctgttcaa gatgggtggg ttggttttga ttatcgccct catatggctg ttcttgacaa	1800
atggattgaa ctctcaagc aaagtgatga atcttgaag atgggtgata ttgtgcacac	1860
actgactaac agaaggtggt cagagaagtg tgttacttat gctgaaagtc atgatcaagc	1920
actagtgggt gacaaaacta ttgcattctg gttgatggac aaggatatgt atgattttat	1980
ggctctggac agaccggcaa cacctagcat tgatcgtgga atagcattgc ataaaatgat	2040
tagacttata acaatggggt taggaggaga aggtatctt aactttatgg gaaatgagtt	2100
cggacatcct gaatggattg attttccaag agctccacaa gtacttcaa atggtaaatt	2160
catcccaggg aataacaaca gttatgataa atgccgtcga agatttgacc tgggtgatgc	2220
ggactatctt aggtatcgtg gcatgctaga gtttgaccgc gcgatgcagt ctctcgagga	2280

aaaatatggg ttcatgacat cagaccacca gtacatatct cgaaagcatg aagaggataa	2340
gatgattata tttgagaagg gagatctggt atttgtgttc aacttocatt ggagtaacag	2400
ctattttgac taccgtgttg gttgtttaaa gccagggaaa tataaggtgg tcttggactc	2460
agatgctgga ctctttggtg gatttggcag gatccatcac actgcagagc acttcactgc	2520
cgattgttca catgacaaca ggccctactc gttctcagtt tattctccta gcagaacctg	2580
cgttgtctat gctccagcgg aatgagaaca ccaagaggca gcatgcaagt gtgtgcggct	2640
gctagtgcga aggagcaaga aaaactagtt gccagcaatc tgtgaacggc tttcctaggt	2700
tctgcttcga tgaatgccgg atagactaga cagcttgctt ttgtgctttg cgctcccaat	2760
ttgtagtttt agtttgtgag ggaaagaaac gtttatttgt aattatctat ggctgtcgaa	2820
cggcgacgaa accatgaacc ccgtatattt gttggtaccg ttcgaactgc cagttataca	2880
tagttctgca cttctgtaca tcttgtgatg cttgaatc	2918